



# Funktionell aktivitet hos inkapslade proteiner i kiseldioxidmikropartiklar

Pro gradu-avhandling i cellbiologi (40 sp)

Minna Lagström, 40705

Handledare: Lasse Leino

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

[minna.lagstrom@abo.fi](mailto:minna.lagstrom@abo.fi)

Åbo, 2020

## **ÅBO AKADEMI**

**Fakulteten för naturvetenskaper och teknik**

**Minna Lagström, 2020**

**Rubrik: Funktionell aktivitet av inkapslade proteiner i kiseldioxidmikropartiklar**

**Pro gradu-avhandling: 55 sidor**

**Nyckelord: Kontrollerad läkemedelsfrisättning, kiseldioxid, inkapsling, mikropartikel, bevacizumab**

---

### **Abstrakt**

Bioterapeutiska proteiner är av intresse då nya läkemedel utvecklas. Eftersom proteiner har en komplex struktur har de viktiga egenskaper såsom hög specifitet, vilket gör att de endast binder till vissa molekyler. Användningen av proteiner utgör ett antal leveransrelaterade utmaningar på grund av olika faktorer. Till exempel proteiner degraderas lätt av enzymer. På grund av utmaningar i leveransen av bioterapeutiska proteiner till specifika vävnader i kroppen finns det behov av nya leveranssystem som tillfälligt skyddar läkemedel och sedan släpper ut dem på ett kontrollerat sätt. Det finns olika metoder att kapsla in proteiner för att överkomma problem med läkemedelsleverans och för att nå ett kontrollerat och långvarigt läkemedelsutsläpp. Målet med detta pro gradu-projekt var att undersöka om bevacizumab, ett läkemedel som inhiberar vaskulär endotelcellstillväxtfaktor (VEGF), bibehåller den funktionella aktiviteten när läkemedlet blivit inkapslat i kiseldioxidmikropartiklar. Vidare var målet att undersöka ifall det inkapslade bevacizumabet kan inhibera effekten av VEGF i cellkultur. Resultaten visade att bevacizumab upprätthåller den funktionella aktiviteten efter inkapslingen. Inkapslat bevacizumab har en hög bindingsaktivitet till VEGF. Dessutom visade resultaten att bevacizumab minskar epitelcellernas metaboliska aktivitet och överlevnadsförmåga. Dessa resultat visar att inkapslat bevacizumab kan binda till och inhibera VEGF i levande celler.

**ÅBO AKADEMI UNIVERSITY**

**Faculty of Science and Engineering**

**Minna Lagström, 2020**

**Headline: Functional activity of encapsulated proteins in silica microparticles**

**M.Sc. thesis: 55 pages**

**Keywords:     Controlled drug release, silicon dioxide, encapsulation,  
microparticle, bevacizumab**

---

## **Abstract**

Biotherapeutic proteins are of interest as new drugs are developed. Their complex structure provides important properties including high specificity, which means that they bind only to specific molecules. However, use of proteins poses several delivery-related challenges due to various factors, including easy degradation by enzymes. Due to the challenges in the delivery of biotherapeutic proteins, there is a need for novel delivery systems that temporarily protect drugs, deliver them to specific tissues and release them in a controlled manner. There are various methods to encapsulate proteins to overcome problems with drug delivery and to achieve a controlled and sustained drug release. The aim of this Master's thesis project was to investigate whether bevacizumab, a drug that inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF), maintains its functional activity after the drug has been encapsulated in silica microparticles. Furthermore, the aim was to study if the encapsulated bevacizumab can inhibit the effects of vascular endothelial cell growth factor in cell culture. The results showed that bevacizumab maintains functional activity after encapsulation. The encapsulated bevacizumab has a high binding activity to VEGF. In addition, the results showed that bevacizumab clearly reduced the metabolic activity and survival of epithelial cells. These results showed that the encapsulated bevacizumab can bind to and inhibit VEGF in living cells.

# INNEHÅLLSFÖRTEKNING

<b>FÖRKORTNINGAR.....</b>	<b>1</b>
<b>1 INLEDNING .....</b>	<b>3</b>
<b>2 LITTERATURÖVERSIKT .....</b>	<b>4</b>
2.1 Bioterapeutiska proteiner.....	4
2.2 Administrering av läkemedel.....	4
2.3 Kontrollerad läkemedelsleverans och frisättning .....	5
2.4 Tillverkning av mikropartiklar .....	7
2.4.1 Kiseldioxid .....	7
2.4.2 Sol-gel-metoden .....	8
2.4.3 Spraytorkning .....	9
2.5 Angiogenes .....	10
2.6 Vaskulär endotelcellstillväxtfaktor .....	12
2.6.1 Vaskulär endotelcellstillväxtfaktor i cancer .....	13
2.6.2 Åldersrelaterad makuladegeneration och VEGF .....	13
2.7 Bevacizumab.....	13
2.8 HUVEC-celler.....	16
<b>3 MÅLSÄTTNING .....</b>	<b>17</b>
<b>4 MATERIAL OCH METODER .....</b>	<b>18</b>
4.1 Tillverkning av kiseldioxidmikropartiklar .....	18
4.1.1 Spraytorkning .....	18
4.1.2 Hydrogeldepot .....	18
4.1.3 Upplösning av inkapslat bevacizumab .....	18
4.2 Kvantitativ proteinanalys.....	19
4.3 Cellodling .....	20
4.4 Cellräkning .....	21

<b>4.5</b>	<b>Överlevnadsanalys med HUVEC-celler.....</b>	<b>21</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Överlevnadsanalys och påverkan av VEGF på celler .....</b>	<b>21</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Mätning av överlevnadsskillnader mellan VEGF och bevacizumab .....</b>	<b>22</b>
<b>4.6</b>	<b>Enzymkopplad immunadsorberande analys av bevacizumab.....</b>	<b>23</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Bindningsaktiviteten hos intakt bevacizumab.....</b>	<b>23</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Bindningsaktiviteten hos degraderad bevacizumab .....</b>	<b>23</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Bindningsaktiviteten hos inkapslat bevacizumab .....</b>	<b>24</b>
<b>4.7</b>	<b>Statistisk analys .....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>RESULTAT.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Optimering av ELISA-analys .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Optimering av VEGF-koncentration .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Påverkan av Tris-Tween80 på bevacizumab.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Påverkan av kiseldioxid-mättad Tris på bevacizumab .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Detektion av bindningsaktiviteten med ELISA .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>Bindningsaktiviteten hos inkapslat bevacizumab och kontrollprovet .....</b>	<b>31</b>
<b>5.3</b>	<b>Bevacizumabets inkapsling och bindningsaktivitet .....</b>	<b>32</b>
<b>5.4</b>	<b>Etablering av överlevnadsanalys .....</b>	<b>35</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Optimering av antalet celler och inkuberingstider .....</b>	<b>35</b>
<b>5.5</b>	<b>Mikroskopering av HUVEC-celler.....</b>	<b>35</b>
<b>5.6</b>	<b>Cellernas överlevnad vid tillsats av VEGF .....</b>	<b>36</b>
<b>5.6.1</b>	<b>Ökad överlevnad och proliferation i cellkultur.....</b>	<b>37</b>
<b>5.7</b>	<b>Det inkapslade bevacizumabet inhiberar VEGF i levande celler .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>40</b>
<b>6.1</b>	<b>Kiseldioxidmikropartiklar i långtidsverkande läkemedelsleverans.....</b>	<b>40</b>
<b>6.2</b>	<b>Inkapslat bevacizumab upprätthåller dess funktionella aktivitet.....</b>	<b>41</b>
<b>6.3</b>	<b>VEGF ökar cellernas överlevnad.....</b>	<b>42</b>
<b>6.4</b>	<b>Bevacizumab inhiberar cellernas överlevnad.....</b>	<b>43</b>

<b>6.5</b>	<b>Slutsatser och fortsatt forskning.....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>TILLKÄNNAGIVANDEN .....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>LITTERATURFÖRTECKING .....</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>BILAGA 1: RECEPT .....</b>	<b>55</b>

## FÖRKORTNINGAR

AMD	Åldersrelaterad makuladegeneration (eng. Age related macular degeneration)
API	Aktiv läkemedelsingrediens (eng. Active pharmaceutical ingredient)
BSA	Bovint serumalbumin (eng. Bovine serum albumin)
DMSO	Dimetylsulfoxid (eng. Dimethyl sulfoxide)
FcγR	Fc gamma-receptor (eng. Fc gamma receptor)
FBS	Fetalt kalvserum (eng. Fetal bovine serum)
HBSS	Hanks' balanserad saltlösning (eng. Hanks' balanced salt solution)
HCL	Väteklorid (eng. Hydrochloric acid)
HIF1α	Hypoxiinducerbar factor-1α (eng. Hypoxia-inducible factor-1α)
HRP	Pepparrotsperoxidas (eng. Horseradish peroxidase)
HUVEC	Human endotelceller från navelsträng (eng. Human umbilical vein endothelial cells)
IM	Intramuskulär (eng. Intramuscular)
IV	Intravenös (eng. Intravenous)
IVT	Intravitreal (eng. Intravitreal)
mRNA	Budbärar-RNA (eng. Messenger RNA)
PBS	Fosfatbuffrad saltlösning (eng. Phosphate buffered saline)
PPM	Antal per miljon (eng. Parts per million)
P/S	Penicillin/Streptomycin
RFU	Relativ fluorescens-enhet (eng. Relative fluorescence unit)
RP-HPLC	Högupplösande omvänd-fas-vätskekromatografi (eng. Reverse phase high performance liquid chromatography)
SC	Subkutan (eng. Subcutaneous)
SEC-HLPC	Gelfiltrering (eng. Size-exclusion high performance liquid chromatography)
SiO <sub>2</sub>	Kiseldioxid (eng. Silicon dioxide)

SLN	Fasta lipidnanopartiklar (eng. Solid lipid nanoparticles)
TEOS	Tetraethylortosilikat (eng. Tetraethyl orthosilicate)
TMB	3,3'-5,5'-tetrametylbensidin (eng. 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine)
TRIS	Tris-(hydroximetyl) aminometan (eng. Tris(hydroxymethyl) aminomethan)
VEGF	Vaskulär endotelcellstillväxtfaktor (eng. Vascular endothelial growth factor)



## 1 INLEDNING

Många biomolekyler såsom proteiner används som läkemedel. Emellertid är leveransen till deras målvävnad utmanande på grund av deras stora molekyelstorlek, svårigheter att passera cellmembran och känslighet för enzymatisk och kemisk nedbrytning (Li et al., 2017). För att överkomma dessa utmaningar med bioterapeutiska proteiner har olika leveranssystem utvecklats. Med kontrollerad läkemedelsleverans är proteiner tillfälligt skyddade, läkemedel kan levereras till ett specifikt organ eller område i kroppen och frisätts på ett kontrollerat sätt. Den kontrollerade läkemedelsleveransen ökar läkemedlets totala effektivitet genom att bibehålla läkemedelskoncentrationen i kroppen inom den optimala nivån under en längre tidsperiod. Olika ämnen kan inkapslas i ett bärarmaterial, till exempel kiseldioxid, som har visat sig vara effektiv och ofarlig för kroppen. En populär teknik för denna typ av inkapsling är sol-gel-metoden. I denna metod bildas det kiseldioxidpartiklar runt läkemedlet med hjälp av metallalkoxider (Barbé et al., 2004).

Bevacizumab (handelsnamn Avastin®) är en humaniserad monoklonal antikropp som inhiberar vaskulär endotelcellstillväxtfaktor (VEGF). VEGF är en endotelcellspecifik mitogen som krävs för angiogenes och är observerad i tumörtillväxt och vid metastaser. Bevacizumab används för cancerbehandling och har även visat sig vara effektiv i okulära sjukdomar såsom åldersrelaterad makuladegeneration (AMD) (Sinapis et al., 2011).

Målet med denna pro gradu-avhandling är att undersöka om bevacizumab, ett-anti-VEGF-läkemedel, bibehåller den funktionella aktiviteten efter inkapslingen med kiseldioxidmikropartiklar. Hypotesen är att inkapslingen skyddar proteinet mot ofördelaktiga omständigheter, till exempel hög temperatur. Inkapslingen erbjuder ett hållbart leveranssystem där läkemedel kontrollerat kan frisätts. Ytterligare undersöks det om proteinet upprätthåller den biologiska aktiviteten i levande celler.

## 2 LITTERATURÖVERSIKT

### 2.1 Bioterapeutiska proteiner

Proteiner är stora molekyler med komplexa strukturer. Dessa makromolekyler, bland annat enzymer, hormoner och antikroppar, deltar i ett antal biologiska signalbanor och har mångfaldiga funktioner. Proteinernas komplexa strukturer möjliggör viktiga egenskaper, inklusive selektivitet och hög specificitet, vilket är viktigt när nya läkemedel utvecklas. Bioterapeutiska proteiner, såsom antikroppar, har visats vara väldigt effektiva och specifika men det finns utmaningar i utvecklandet av dessa läkemedel. Proteinernas leverans till specifika vävnader har flera utmaningar på grund av olika faktorer; de kan vara stora, hydrofila, ha låg permeabilitet genom biologiska membraner och degraderas lätt av enzymer. Proteinernas komplexa struktur gör dem instabila och vilken som helst förändring kan leda till förlust av proteinaktivitet och irreversibel aggregering av proteiner. Proteiner är lämpliga kandidater för formuleringar med kontrollerad frisättning (Vaishya et al., 2015).

### 2.2 Administrering av läkemedel

Den kemiska strukturen av proteiner tillåter att de kan utföra specifika reaktioner i kroppen, öka effektivitet och minska oönskade biverkningar. Att använda proteiner för terapeutiska ändamål möts av många hinder, såsom deras korta halveringstid i blodomloppet, vilket gör det nödvändigt att upprepa läkemedels administrering, kemiska och fysiska instabilitet och snabb denaturering i magen och i tarmen (Ibraheem et al., 2014). Dessa egenskaper gör att proteinets läkemedelsleverans via oral väg är mycket utmanande och en stor del av godkända bioterapeutiska proteiner levereras genom parenterala vägar, vilka är intramuskulära (IM, eng. intramuscular), intravenösa (IV, eng. intravenous) eller subkutana (SC, eng. subcutaneous) vägar. Användning av till exempel intravitreal injektion (IVT) för administration av läkemedel orsakar flera problem eftersom det är smärtsamt, dåligt tolererat av patienter, kräver upprepning och höga doser av läkemedel, vilket kan leda till toxiska effekter (Vaishya et al., 2015).

Användning av kontrollerad läkemedelsfrisättning med att kapsla in proteiner överkommer flera av dessa problem. Intravenös injektion av läkemedel kan användas för

att behandla t.ex. okulära sjukdomar. Användning av dessa injektioner med inkapslade proteiner minskar toxiska effekter och leder till längre tid mellan injektioner eftersom de inkapslade proteinerna kan frigöras på ett kontrollerat sätt i en lång tidsperiod. Detta minskar risken för komplikationer (Abrishami, 2009).

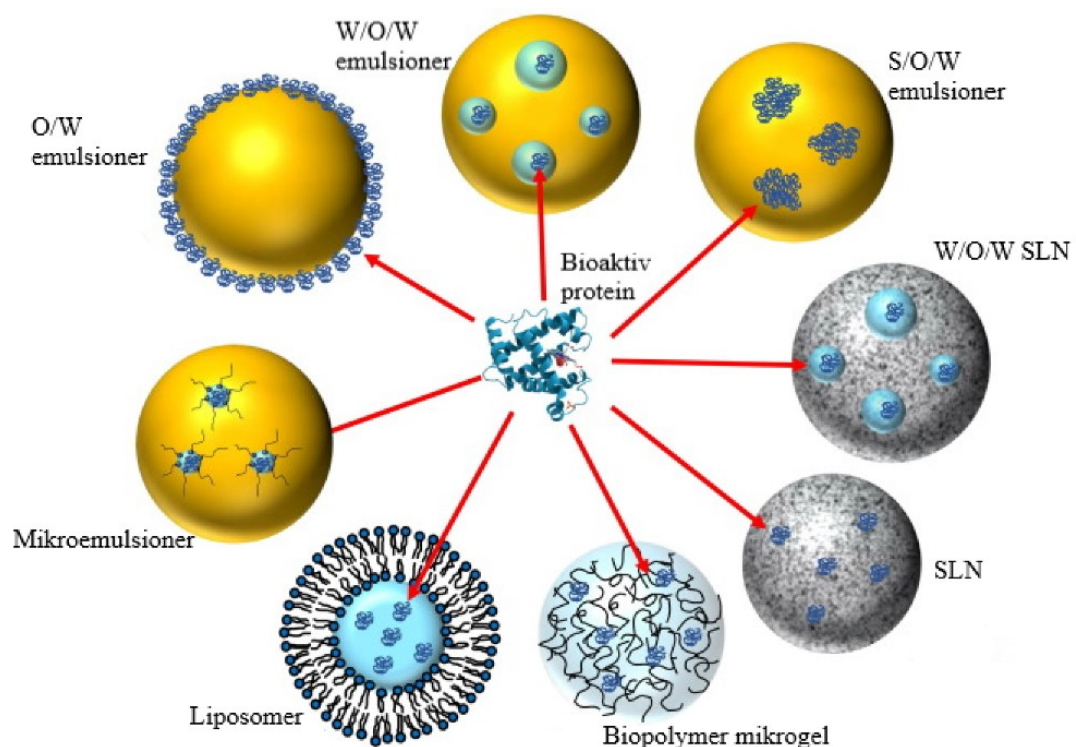
### 2.3 Kontrollerad läkemedelsleverans och frisättning

På grund av utmaningar i leveransen av bioterapeutiska proteiner finns det ett behov för leveranssystem av läkemedel som är minimalt invasiva och tillåter kontrollerad läkemedelsfrigöring. Olika material har utvecklats som används vid läkemedelsleverans för att tillfälligt skydda läkemedlen och leverera dem till specifika vävnader och sedan frigöra dem på ett kontrollerat sätt (Andrew et al., 2010). Fördelarna med detta är bättre *in vivo* stabilitet, lokal läkemedelsleverans, färre biverkningar, minskning av dos och doseringsfrekvens (Vaishya et al., 2015). Ett brett spektrum av olika leveranssystem har utvecklats att kapsla in, skydda och frisätta bioaktiva molekyler och många av dessa leveranssystem är lämpliga för proteiner och peptider.

Liposomer består av koncentriska ringar av fosfolipidmolekyler organiserade svans-till-svans, som huvudsakligen hålls ihop av hydrofoba interaktioner. Liposomer kan kapsla in hydrofila ämnen i deras hydrofila kärna och amfifila eller lipofila ämnen i deras hydrofoba dubbla lipidlager. Liposomer kan också användas för att kapsla in både hydrofila proteiner och proteiner som har stora hydrofoba domäner.

Mikroemulsioner är termodynamiskt stabila kolloidala dispersioner bestående av kluster av ytaktiva ämnen, olja och/eller vattenmolekyler som hålls ihop av hydrofoba interaktioner. Mikroemulsioner kan kategoriseras som olja-i-vatten (O/W, eng. oil-in-water) eller vatten-i-olja (W/O, eng. water-in-oil) beroende på den relativa platsen för de polära och icke-polära domänerna i systemet. O/W-mikroemulsioner är osannolikt effektiva för att kapsla in de flesta bioaktiva proteiner eftersom proteiner är för hydrofila för att fångas i det hydrofoba inre av mikroemulsionspartiklarna. Till skillnad från mikroemulsioner, är emulsioner termodynamiskt instabila kolloidala dispersioner som är bildade av två icke blandbara vätskor (vanligtvis olja och vatten) med en av vätskorna dispergerad som små droppar i den andra. Emulsioner kan också kategoriseras som O/W

eller W/O beroende på den relativa placeringen av olja- och vattenfaser. O/W-emulsioner är olämpliga för proteinernas inkapsling i oljedropparna eftersom droppens inre är för hydrofob. Däremot är W/O-emulsioner mer lämpliga för inkapsling av bioaktiva proteiner eftersom dropparna har ett hydrofilt inre, men dessa emulsioner är användbara endast med läkemedel som har en kontinuerlig lipid-fas. Dessa begränsningar kan övervinnas genom ytterligare homogenisering av W/O-emulsioner med en vatten-fas som innehåller en hydrofil emulgator för att bilda vatten-i-olja-i-vatten (W/O/W, eng. water-in-oil-in-water) emulsioner. För att kapsla in proteiner finns det även fast form-i-olja-i-vatten (S/O/W, eng. solid-in-oil-in-water) emulsioner. Dessa består av pulverformiga proteiner dispergerade i en oljefas som innehåller ett lipofilt emulgeringsmedel som sedan homogeniseras i en vatten-fas som innehåller en hydrofil emulgator (Figur 1) (McClements, 2018).



Figur 1. Vanligaste typer av kolloidala leveranssystem för inkapsling av bioaktiva proteiner. O/W är för olja-i-vatten. W/O/W är för vatten-i-olja-i-vatten. S/O/W är för fast form-i-olja-i-vatten. SLN står för fasta lipidnanopartiklar. Bild modifierad från (McClements, 2018).

Fasta lipidnanopartiklar (SLN, eng. solid lipid nanoparticles) är partiklar tillverkade av stabiliserade ytaktiva medel och fasta lipider, det vill säga lipider som är fasta även vid

37 °C. De viktigaste egenskaperna hos SLN är stabilitet, kontrollerad läkemedels frisättning, platsspecifik inriktning och de skyddar läkemedlet från degradering. Potentiella nackdelar för SLN är till exempel otillräcklig laddningskapacitet av läkemedlet vid inkapslingen (Wissing et al., 2004). För att utveckla bättre metoder för att inkapsla proteiner kan SLN också tillverkas från W/O/W-emulsioner (Figur 1). Den största fördelen med denna metod är att man inte behöver höga temperaturer som kan denaturera proteiner. SLN tillverkad från W/O/W-emulsioner passar bra för att kapsla in bioaktiva proteiner (Gallarate et al., 2009).

Biopolymer mikrogeler kan effektivt kapslas in bioaktiva komponenter. Biopolymer mikrogel formar små partiklar, vanligtvis 100 nm till 1000 nm i diameter, vars inre består av ett tredimensionellt nätverk av tvärbundna biopolymermolekyler som fångar en betydlig mängd av lösningsmedel (Figur 1). Denna typ av partikel kallas också nanogel, hydrogel biopolymerpartiklar eller mikrosfär. Biopolymer mikrogeler formas typiskt med en tvåstegsprocess som innehåller partikelbildning och partikelgelning (Oh et al., 2009).

## **2.4 Tillverkning av mikropartiklar**

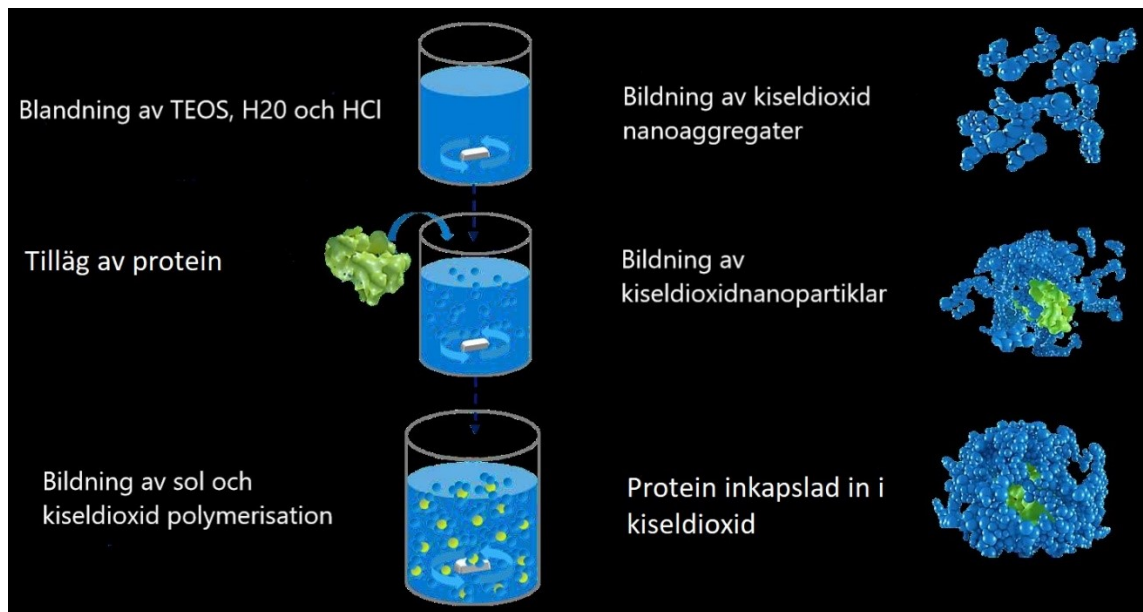
### **2.4.1 Kiseldioxid**

Kisel är ett av de vanligaste ämnena på jorden och det finns oftast i form av kiseldioxid ( $\text{SiO}_2$ ). Kiseldioxid förekommer i naturen till exempel i marken, vattenmiljöer och växter. Kiseldioxidets yta innehåller funktionella grupper som är idealiska för enzymstabilisering och proteinadsorption. Inkapsling av biomolekyler i kiseldioxid skyddar mot kemisk denaturering och proteaser som är nedbrytande enzymer. Kiseldioxid kan produceras syntetiskt i laboratoriet, vilket möjliggör användning av kiseldioxid i flera teknologier (Tiware et al., 2012). Kiseldioxid är ett mångsidigt material som kan syntetiseras i många olika former som kan innehålla olika mängder vatten. Kiseldioxid upplöses i kroppsvätskor till ofarliga föreningar som utsöndras ur från kroppen i lösform i urinen (Viitala et al., 2005).

### 2.4.2 Sol-gel-metoden

Sol-gel-metoden är en process som möjliggör att kapsla in olika typer av biologiskt aktiva ämnen i  $\text{SiO}_2$ . Små läkemedelsmolekyler, proteiner, celler, virus och andra biologiskt aktiva ämnen, av vilka några är mycket känsliga för den fysikaliska miljön, har framgångsrikt kapslats in i kiseldioxid. Amorfa, sol-gel härledda  $\text{SiO}_2$ -matriser är kända för att vara kompatibla med och nedbrytbara i levande vävnad (Viitala et al., 2007).

I sol-gel-metoden används metallalkoxider, till exempel tetraetylortosilikat (TEOS, eng. tetraethyl orthosilicate) som utgångsmaterial, eftersom de reagerar lätt med vatten. Skadliga effekter av TEOS-nedbrytningsprodukter kan minimeras, vilket gör dem ofarliga för kroppen och är säkra för de inkapslade ämnena. Användning av TEOS i sol-gel-processen bildar endast etanol som biprodukt som levande organismer tolererar väl. Om nedbrytningsprodukter av alkoxid eller etanol kan förväntas orsaka skada för de inkapslade proteinerna kan deras mängd minskas genom att evaporera och genom att tillsätta vatten i olika stadier av processen (Jokinen et al., 2008). I sol-gel-processen bildas en sol (en kolloid lösning i vätskan) eftersom utgångsmaterialet genomgår hydrolys- och kondensationsreaktioner. Solen ändras till en gel eller bildar en stabil sol. Om reaktioner behöver påskyndas kan syra eller bas användas som katalysator (Rahman, 2012). I kondensationsreaktionen bildas monomerer, som är molekyler som kan reagera tillsammans med andra monomerer och bilda polymerer. Dessa monomer kan bilda större molekyler i en polymerisationsreaktion och detta leder till att kiseldioxidpartiklar formas. Vid gelning växer och aggregerar dessa partiklar. Till slut formas en sammanhängande nätverk. Gelen bildas när nätverket expanderas helt i vätskan (Dunn et al., 1998). En aktiv läkemedelsingrediens (API, eng. active pharmaceutical ingredient) läggs till när utgångsmaterialet har blandats med vatten och möjligtvis med en katalysator (Figur 2) (Viitala et al., 2005).



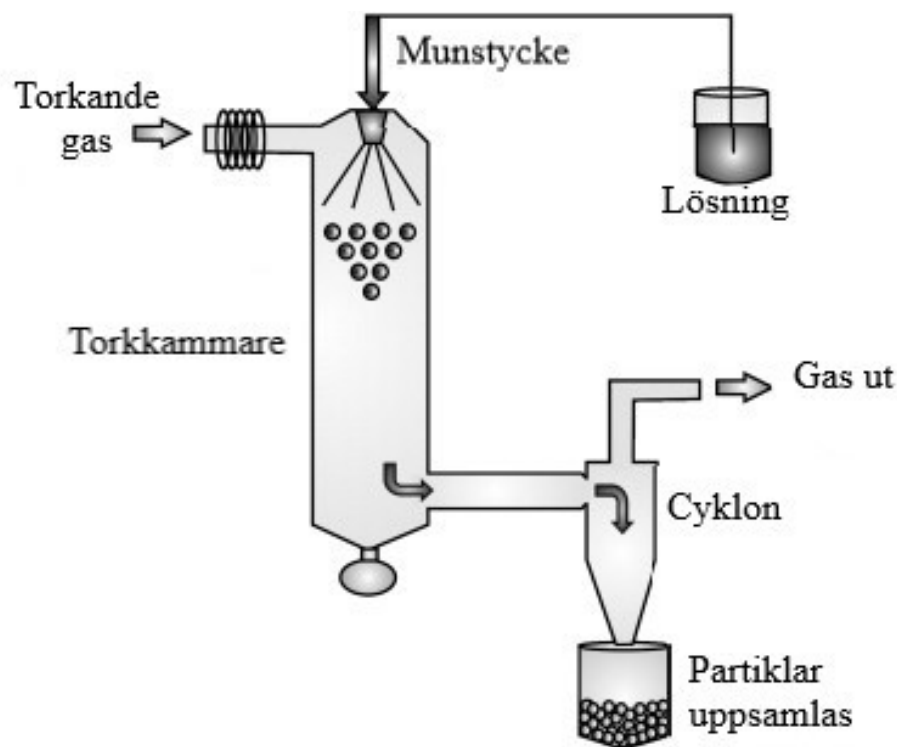
Figur 2. Sol-gel-metoden för att kapsla in aktiv läkemedelsingrediens. TEOS används som utgångsmaterial och blandas med vatten och HCl som fungerar som katalysator. API läggs till i suspensionen. Solen bildas eftersom TEOS genomgår hydrolys- och kondensationsreaktioner. Kiseldioxid börjar bilda aggregat. Till slut har API blivit kapslad in i kiseldioxid. Bild modifierad från (Noppari et al., 2019).

I sol-gel-metoden sker bildning av gel på grund av kovalenta bindningar och detta är irreversibelt. Pulver kan formas genom spraytorkning av sol innan en gelen bildas (Schubert och Hüsing, 2019).

### 2.4.3 Spraytorkning

Spraytorkning är en populär teknik som används för att torka vattenhaltiga eller organiska lösningar, suspensioner och emulsioner i bland annat farmaceutisk industri. Spraytorkningen involverar sprutning av flytande formulering till ett varmt torkmedium, till exempel luft eller kväve. Droppar som bildas från finfördelningsprocessen torkas genom evaporation av lösningsmedlet, vilket formar partiklar som uppsamlas som ett torrt pulver med hjälp av en cyklon som trycker de fasta partiklarna ner i en kammare (Figur 3). Torkningen fortsätter tills ett önskat fukttinnehåll av partiklarna uppnås. Spraytorkningsprocessen innehåller både bildning av partiklar och torkning. Olika processparametrar påverkar de fysikalisk-kemiska egenskaperna i det producerade pulvret. Dessa parametrar är torkmediumets temperatur och trycket i finfördelningen. Egenskaper av de spraytorkade pulvren kan kontrolleras. Med olika utformningar av

spraytorkaren är det möjligt att planera en torkning som producerar antingen fina eller grova partikelpulver eller granulat (Masters, 2002).



Figur 3. Spraytorkningsprocessen. Den flytande formuleringen sprutas till ett varmt torkmedium. Lösningsmedel evaporeras och partiklar formas. En cyklon trycker partiklarna ner in en kammare. Bild modifierad från (Sosnik och Seremeta, 2015).

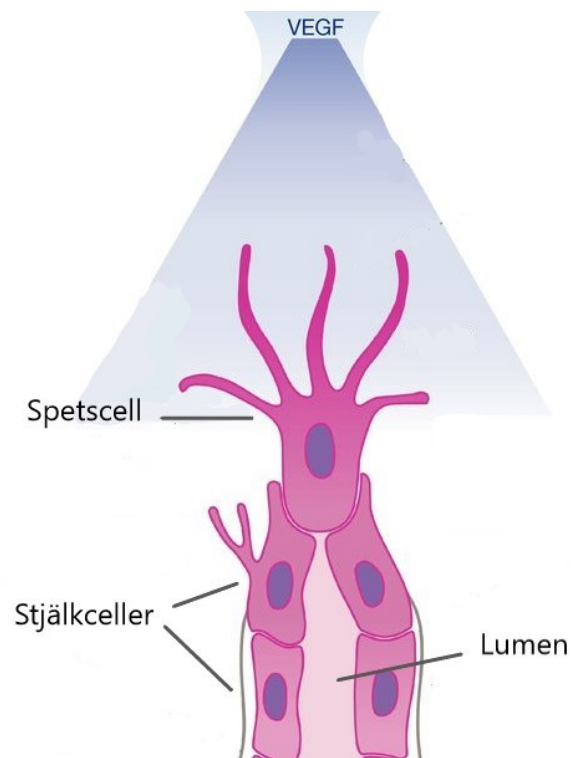
## 2.5 Angiogenes

Vävnader är beroende av leverans av blod. Endotelceller täcker blodkärlens insida. Endotelceller har förmågan att reglera mängden av celler och deras arrangemang för att anpassa lokala behov. För att förstå hur ett vaskulärt system utvecklas och hur det anpassar sig till omväxlande behov av vävnader måste man förstå hur endotelcellerna fungerar. Endotelceller bildas från specifika ställen i det tidiga embryot från prekursor som också ger upphov till blodceller. Från dessa ställen migrerar, prolifererar och differentierar de tidiga embryonala endotelcellerna till att forma grunden för blodkärlen. Denna process kallas vaskulogenes. Efterföljande tillväxt och förgrening av blodkärl genom kroppen sker huvudsakligen genom proliferation och rörelse av endotelceller från dessa första blodkärl i en process som kallas angiogenes (Alberts et al., 2014).



Angiogenes är väsentlig i unga organismer när de växer och i äldre organismer när vävnader till exempel repareras (Figg och Folkman, 2008).

Varje nytt blodkärl härstammar från ett kapillärt utskott från sidan av en existerande kapillär eller venol (Folkman, 2007). I änden av utskottet som leder vägen är en spetscell som är en specialiserad endotelcell, en sorts ledarcell, som banar väg för de nya blodkärlen (Figur 4). Spetscellen har en form av genuttryck som är annorlunda från efterföljande celler, som kallas stjälkceller. Det mest påfallande kännetecknet av spetscellen är att den formar många långa utskott, filopodia, som liknar uppsvällningar i de växande ändorna på nervcellsaxoner (eng. neuronal growth cone). Med dessa filopodia känner sig spetscellen fram och navigerar i vävnaden. Kolumnen av stjälkceller bakom spetscellen delar sig och bildar en rörformad struktur (eng. lumen) som så småningom blir till ett nytt blodkärl (Alberts et al., 2014). Spetscellen rör sig mot vaskulär endotelcellstillväxtfaktor (VEGF, eng. vascular endothelial growth factor), vilket är en av de viktigaste molekyler som reglerar endotelceller och kontrollerar vaskulär utveckling (Crawford och Ferrara, 2009).



Figur 4. Illustration av spets- och stjälkceller. Spetscellen rör sig mot VEGF-gradienten medan stjälkceller delar sig och formar en lumen som blir de nya blodkärlen. Bild modifierad från (Andrade och Potente, 2017).

## 2.6 Vaskulär endotelcellstillväxtfaktor

För att passa ihop med behov av vävnader, regleras blodkärltillväxt och VEGF-produktionen genom förändringar i stabiliteten av dess budbärar-RNA (mRNA, eng. messenger-RNA) och i transkriptionshastigheten. Brist på syre i de flesta olika typer av celler, orsakar en ökning i den intracellulära nivån av en transkriptionsfaktor kallad hypoxiinducerbar faktor-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ , eng. hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ). HIF1 $\alpha$  stimulerar transkription av VEGF och andra gener vars produkter är nödvändiga när syrenivån är bristfällig. VEGF-proteinet utsöndras, diffunderas genom vävnaden och påverkar närliggande endotelceller. Dessa stimulerar endotelcellerna att proliferera och att producera proteaser som hjälper dem att spjälka vägen igenom basal lamina av huvudkapillären eller venolen och formar sedan utskottet. Spetsceller av utskottet detekterar VEGF-gradienten och rör sig mot dess källa. När de nya blodkärlen bildas, får vävnader mera blod och därefter ökar syrekoncentrationen. Därefter sjunker HIF1 $\alpha$ -

aktiviteten, och både VEGF-produktionen och angiogenesen upphörs (Alberts et al., 2014).

### **2.6.1 Vaskulär endotelcellstillväxtfaktor i cancer**

Angiogenes, där nytt kärlsystem bildas i och runt tumören, är väsentlig för utveckling och tillväxt av tumörer. Innan en tumör kan växa över 1–2 mm, kräver den blodkärl för att få näringsämnen och syre. VEGF är uppreglerad i cancer, vilket leder till aktivering av tumörens angiogenes, vilket gör att den kan växa exponentiellt. Tumörvaskulatur som är formad under inverkan av VEGF är strukturellt och funktionellt onormal. Blodkärlen är oregelbundet formade, slingriga, har döda ändar och är inte organiserade i venoler, arterioler och kapillärer. De är också läckande och hemorragiska, vilket leder till högt interstitiellt tryck. Detta innebär att blodflödet i tumören är suboptimalt, vilket leder till hypoxia och ytterligare produktion av VEGF. Denna centrala roll för VEGF i produktionen av tumörvaskulatur gör det till ett rationellt mål för cancerbehandlingar (Carmeliet, 2005).

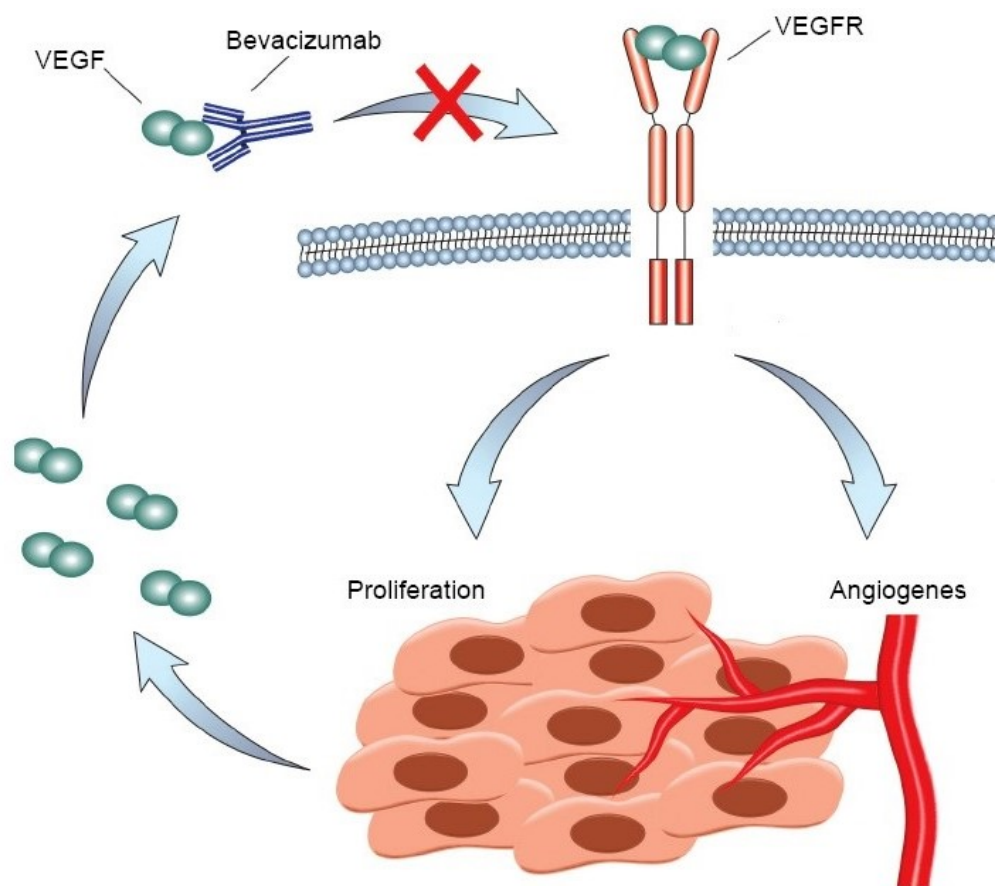
### **2.6.2 Åldersrelaterad makuladegeneration och VEGF**

Åldersrelaterad makuladegeneration (AMD, eng. age-related macular degeneration) är en degenerativ sjukdom i näthinnan som orsakar gradvis försämring av central syn. AMD är den vanligaste orsaken till visuell funktionsnedsättning hos äldre vuxna i utvecklade länder (Mckay et al., 2009). Ett AMD kännetecken är en patologisk kärlnybildning. De nya blodkärlen är onormala och kan bli läckande, vilket leder till att blod och vätska kan blöda in i näthinnan och skada celler i näthinnan (Chakravarthy et al., 2010). Studier har visat att VEGF är överuttryckt i AMD. Vid behandling av AMD injiceras anti-VEGF-läkemedel intravitrealt (IVT), vilket betyder att läkemedlet injiceras direkt i glaskroppen (Lim et al., 2012).

## **2.7 Bevacizumab**

Bevacizumab är en humaniserad monoklonal anti-VEGF-IgG antikropp som säljs under handelsnamnet Avastin (Wang et al., 2004). VEGF binder till VEGF-receptorer (VEGFR-1 och VEGFR-2) och till neuropilin-coreceptorer (NRP-1 och NRP-2) med hög bindningsaffinitet. Dessa receptorer är uttryckta i endotelcellernas yta och spelar en viktig

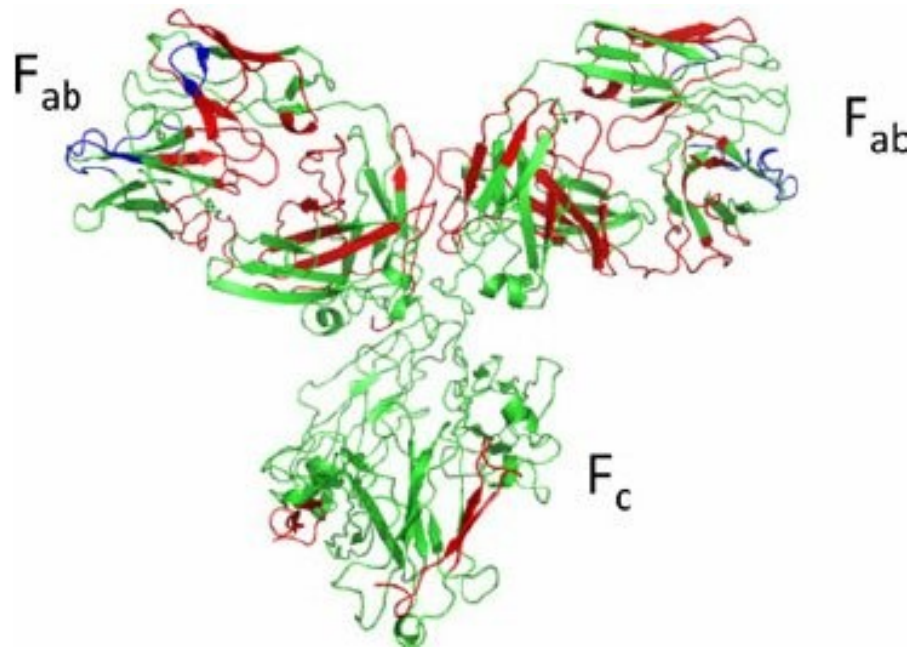
roll i angiogenesen genom att stimulera endotelcellernas proliferation. Bevacizumab inhiberar VEGF-molekyler att binda till receptorer i cellytan och förhindrar sålunda angiogenes och tumörens tillväxt (Figur 5). Dessa effekter minskar också interstitiellt tryck, ökar vaskulär permeabilitet, kan öka leveransen av kemoterapeutiska läkemedel och inducera endotelcellernas apoptos i tumören (Kazazi-Hyseni et al., 2010). Bevacizumab används till exempel i flera olika cancerformer eftersom VEGF reglerar angiogenes i tumörer (Zhang et al., 2016). Bevacizumab används också vid behandling av AMD (Li et al., 2012).



Figur 5. Inhibering av VEGF-signalerings. VEGF ökar cellernas proliferation och tillsammans med andra receptorer kontrollerar angiogenes. Bevacizumab binder till VEGF och förhindrar VEGF aktivering. Bild modifierad från (Levin och Dowell, 2017).

Bevacizumab binder 97 % av mängden VEGF i serum. VEGF i serum är huvudsakligen frigjort från blodplättar som har påvisat upptag av bevacizumab. Blodplättarna kan frisätta bevacizumab vid platser med endotel skada och därmed leverera den till tumören med relativt höga koncentrationer och rikta bevacizumab till tumörcellernas VEGF (Verheul et al., 2007).

Monoklonala antikroppar utgör en viktig klass av terapeutiska proteiner på grund av deras verkningsmekanismer och hög specificitet. Även om monoklonala antikroppar är relativt termodynamiskt stabila jämfört med andra proteinläkemedel, degraderas de lätt kemiskt eller fysiskt särskilt i formuleringar med hög koncentration, vilket är nödvändigt för de flesta terapeutiska produkter av monoklonala antikroppar. Monoklonala antikroppar med hög molekylvikt kan också forma aggregat, vilket anses vara en potentiell orsak till biverkningar av läkemedel med monoklonala antikroppar. Aggregering i lågt pH har föreslagits ske mellan CH<sub>2</sub>-domäninteraktioner. Fab-fragmenten har visat vara mer känsliga mot andra omständigheter till exempel hög temperatur och formulering med hög koncentration. Interaktioner mellan Fab-domäner (Figur 6) bildar aggregat i höga temperaturer. En utmaning är att utveckla tillverkningsprocesser och dosformuleringar som kan förhindra nedbrytning av antikroppar och försäkra produktkvalitet (Zhang et al., 2012). Fab-domäner har varierande aminosyresekvenser som är ansvariga för att antikroppen binder till antigenen. Fc-domänen (Figur 6) förmedlar en cellulär respons genom en Fc-specifik transmembranreceptor, Fc-gamma receptor (FcγR, eng. Fc gamma receptor) (De Aguiar och De Moraes, 2019).



Figur 6. Bevacizumabets proteinstruktur. Fab-domäner är känsliga till exempel mot hög temperatur och interaktioner mellan Fab-domäner kan leda till aggregering av bevacizumab. Bilden från (Zhang et al., 2012).

Mekanismer för resistens mot angiogenetiska läkemedel inkluderar utveckling av alternativa angiogenetiska signaleringsbanor. Anti-VEGF-läkemedelsresistens kan också förekomma genom att öka nivåer av tillväxtfaktorer eller VEGF-receptorer. Högre nivåer av receptorer kan leda till fler problem när användningen av anti-VEGF-läkemedlet avbryts och till en snabbare återväxt av tumörens blodkärssystem. Kombinationen av bevacizumab med kemoterapi kan förhindra uppkomsten av anti-VEGF-läkemedelsresistens (Mancuso et al., 2006).

## 2.8 HUVEC-celler

Humana endotelceller från navelsträng (HUVEC, eng. human umbilical vein endothelial cells) spelar en viktig roll som modell-system för att studera till exempel reglering av funktioner i endotelceller och angiogenes. Navelsträngen från människa har blivit en av de viktigaste källorna till vaskulära endotelceller. När HUVEC-celler odlas med heparin och hypofyseextrakt, upprätthåller cellerna nästan alla funktioner som nativa vaskulära endotelceller inklusive specifika cellmarkörer såsom cytokiner, tillväxtfaktorer och specifika signaleringsvägar för VEGF. HUVEC-celler är en bra *in-vitro* modell för att studera till exempel cellproliferation (Park et al., 2006).

### 3 MÅLSÄTTNING

Avhandlingens mål är att undersöka om inkapslingen i kiseldioxidmikropartiklar påverkar proteinets funktionalitet. Hypotesen är att inkapslingen skyddar proteiner mot ofördelaktiga omständigheter, till exempel hög temperatur. Inkapslingen erbjuder ett hållbart leveranssystem där läkemedel kan släppas ut kontrollerat. Fördelen är att detta eliminerar behovet av upprepad dosering för att upprätthålla terapeutiska effekter (Tyagi et al., 2018). I projektet studerades bevacizumab (handelsnamn Avastin) som är en humaniserad monoklonal antikropp. Bevacizumab valdes eftersom det kan till exempel användas i behandlingar mot åldersrelaterad maculadegenerering (AMD) och i olika cancerbehandlingar (Sousa et al., 2017).

Syften med denna pro gradu-avhandling är att

- 1) Undersöka om inkapslingen i kiseldioxidmikropartiklar påverkar proteinets funktionella aktivitet.
- 2) Undersöka om proteinet har en biologisk aktivitet efter inkapslingen.

## **4 MATERIAL OCH METODER**

### **4.1 Tillverkning av kiseldioxidmikropartiklar**

#### **4.1.1 Spraytorkning**

Mikropartiklar formades med en process kallad spraytorkning. Bevacizumab-mikropartiklarna som användes i detta projekt var färdigt tillverkade i spraytorkningslaboratoriet på DelsiTech. Solen med polymeriserad kiseldioxid innehåller API. Mikropartiklarna formas från solen med en spraytorkningsmetod. I denna process är proteinkiseldioxidpartiklarna i vätskan som sprutas i små droppar genom en het gasström. Lösningssmedel evaporeras och dropparna som blivit en aerosol faller mot botten av en kammare och kan torkas med varm luft. Slutprodukten för denna metod är mikropartiklar som innehåller det inkapslade proteinet (Jain et al., 2012).

#### **4.1.2 Hydrogeldepot**

En hydrogeldepot tillverkas efter spraytorkning. Spraytorkade mikropartiklar som innehåller bevacizumab blandades med löslig kiseldioxidsol och denna blandning överfördes i en spruta före sol förändrades till en hydrogel. Hydrogel bildas inne i sprutan och kan injekteras med en nål direkt in i målvävnaden (Jokinen et al., 2016). Efter injektionen omformas gelen i vävnaden så att partiklarna inte kommer ut utan bildar en enhetlig depot som börjar degraderas (Chen et al., 2017).

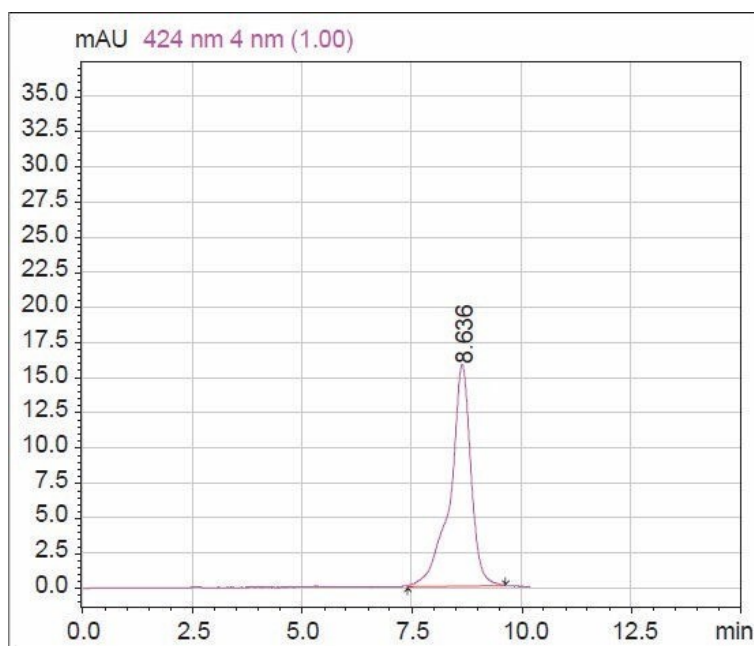
#### **4.1.3 Upplösning av inkapslat bevacizumab**

Före analysering av proverna med det inkapslade bevacizumabet, dissolverades de i 50 mM TRIS-lösning med 0,05 % tween80 (VWR) med pH 7,4 vid +37 °C i ett +37 °C vattenbad med en skakare. En del av de inkapslade bevacizumab-proverna var i form av mikropartiklar och en del av proverna var i hydrogel-depot. Inkapslat bevacizumab upplöses så småningom i TRIS-bufferten. Lösningen byttes efter 24, 48 och 72 timmar och den gamla TRIS-bufferten med upplöst bevacizumab flyttades till falconrör. Till slut fanns prover från tre olika tidpunkter med olika koncentrationer av bevacizumabet.



## 4.2 Kvantitativ proteinanalys

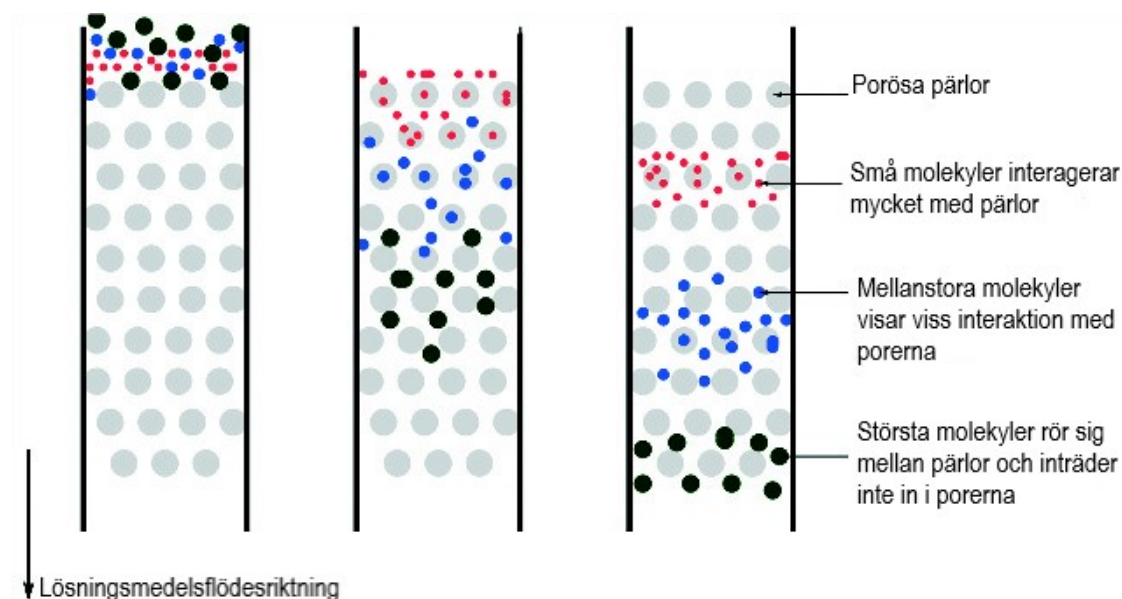
För kvantitativ analysering av proteiner användes högupplösande omvänd-fas vätskekromatografi (RP-HPLC, eng. reverse phase high performance liquid chromatography) och gelfiltrering (SEC-HPLC, eng. size-exclusion high performance liquid chromatography). Kromatografi är en separationsmetod som baserar sig på ämnens löslighet i olika faser. Gemensamt för alla kromatografiska metoder är att man har en stationär fas och en mobil fas som inte löser sig i varandra. Den första fasen är hydrofob och den andra fasen är hydrofil. Separationen vid kromatografi uppkommer på grund av att olika ämnen löser sig bättre i en av faserna. I RP-HPLC är den stationära fasen icke-polar och den mobila fasen är vattenhaltig och polär. Principen i RP-HPLC är att polära komponenter elueras snabbare ut än opolära komponenter och detta leder till att olika komponenter separeras och kan därmed detekteras (Figur 7) (Whitford, 2005).



Figur 7. En typisk kromatograf som visar detektion av molekyler (Mishra et al., 2014).

SEC-HPLC är en kromatografisk metod där molekyler i lösningen separeras enligt deras storlek. Kolumnen i kromatografen innehåller porösa pärlor. Dessa porer är lika stora och är skapad genom kovalenta krosslänknings av polymerer. I en blandning av olika proteiner med olika molekyllmassor är vissa tillräckligt små för att ta sig in i poreerna och

deras diffusion genom kolumnen bromsas. Större proteiner kan inte ta sig in i porerna och diffunderar snabbare genom kolumnen (Figur 8) (Ge-Healthcare, 13.11.2019).



Figur 8. SEC-HPLC. Molekyler större än porerna kan inte diffundera in i pärlorna så de diffunderar först. Mellanstora molekyler kan tränga sig in i porerna i varierande grad baserat på deras storlek. Minsta molekyler kan inträda i porerna och diffunderar sist. Bild modifierad från (Whitford, 2005).

RP-HPLC användes för att kontrollera bevacizumab-koncentrationen i lösningen i både intakta och inkapslade prover och SEC-HPLC användes för att kontrollera att bevacizumab inte hade bildat aggregat i lösningen.

### 4.3 Cellodling

Humana endotelceller från navelsträng som användes var erhållna från Sigma-Aldrich. HUVEC-celler är adherenta celler, vilket betyder att cellerna odlades i polystyren-cellodlingsskålar med endotelcelltillväxt medium (eng. endothelial cell growth medium) (Cell Applications, Inc.), 2 % fetalt kalv serum (FBS, Sigma-Aldrich), 0,2 % penicillin/streptomycin (P/S) och 2,5 µg/ml amfotericin B (Gibco). Cellerna odlades i en inkubator vid +37 °C med 5 % koldioxid samt en vattenmättad atmosfär. Eftersom dessa celler är adherenta fäster de sig i botten av cellkulturskålen då de växer. Cellerna tvättades med Hanks' balanserad saltlösning (eng. Hanks' balanced salt solution) (HBSS, Sigma-Aldrich) och för subkultivering användes 0,25 % trypsin (Biowest) för att frigöra

cellerna från odlingsytan. Nästan all trypsinlösning aspirerades bort och cellkulturflaskan inkuberades i rumstemperatur några minuter. Efter trypsinbehandlingen tillsattes endotelcelltillväxt-medium och cellsuspension flyttades över till sterila Falconrör och centrifugerades i 200xG i fem minuter. Mediumlösningen aspirerades bort och cellpelleten suspenderades i 2 ml endotelcelltillväxt-medium. Antal celler räknades och nytt medium tillsattes i Falconröret så att det var 500 000 celler/ml. 1 ml av cellsuspension tillfördes i nya cellkulturflaskor med endotelcelltillväxt medium. Flaskorna placerades vid +37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> för tillväxt. Efter den fjärde subkultivering flyttades cellerna till frysningsmedium med 10 % FBS och 10 % dimetylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich). Högre serumnivå förbättrar cellernas livsduktighet och återhämtning vid cellernas upptining. Kristallbildningen är skadligt för cellerna vid nedfrysningen och för att minska denna tillsätts DMSO som penetrerar cellerna och förhindrar kristallbildning (Keng et al., 1985). Cellerna frystes ned och förvarades vid – 80 °C i 24 timmar och flyttades sedan över till flytande kväve för långtidsförvaring.

#### **4.4 Cellräkning**

Då cellerna skulle räknas lösgjordes cellerna från cellkulturflaskorna med trypsin eller flyttades från kryoröret till sterila Falconrör. Rören centrifugerades i 200xG i fem minuter. Det gamla mediet pipetterades bort och 1 ml eller 2 ml nytt medium tillsattes till rören och suspenderades. Cellerna räknades med Burkers kammare genom att göra en tiofaldig utspädning av cellsuspension i ett Eppendorfrör. 10 µl av cellsuspension pipetterades i kammaren och fem A-rutor räknades med ett ljusmikroskop. Mängden av celler räknades enligt formeln;  $N \times 10\,000 \times SF$ , där N är medelvärde av fem A-rutor och SF är spädnings faktor.

#### **4.5 Överlevnadsanalys med HUVEC-celler**

##### **4.5.1 Överlevnadsanalys och påverkan av VEGF på celler**

För att mäta cellernas överlevnad blev  $5 \times 10^5$  HUVEC-celler upptinades i ett sterilt Falconrör med kallt endotelcell basal medium (eng. endothelial cell basal medium) (Cell applications, Inc.) utan näringsämnen och med 0,2 % P/S och 2,5 µg/ml amfotericin B. Röret centrifugerades i 200xG i fem minuter. Mediet aspirerades bort och cellpelleten

suspenderades i 1 ml endotelcell basal medium. Cellerna räknades och nytt medium tillsattes i Falconröret så att koncentrationen var  $1 \times 10^5$  celler/ml. Cellsuspension pipetterades i en steril 96-brunnars platta (Cellstar) med  $6 \times 10^3$  celler/brunn. Olika koncentrationer (0–100 ng/ml) av vaskulär endotelcellstillväxtfaktor (VEGF, Prospeg) tillsattes till brunnarna. Plattan inkuberades vid +37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> i fyra dagar. I slutet av inkubationen tillsattes 10 µl av Alamar Blue-reagens (Invitrogen) till varje brunn och plattan inkuberades i ytterligare sex timmar. Efter inkuberingstiden mättes fluorescens med 544/590 nm excitation/emission (Hidex Sense). Alamar Blue-reagens är en fluorimetrisk/kolorimetrisk tillväxtindikator baserad på metabolisk aktivitet, vilket reflekterar cellernas proliferation och överlevnad. Allt cellarbete gjordes sterilt i ett laminarskåp.

#### **4.5.2 Mätning av överlevnadsskillnader mellan VEGF och bevacizumab**

Det har visat att bevacizumab neutraliserar VEGF och blockerar signaltransduktionen genom VEGF receptorerna (Shih och Lindley, 2006). För att undersöka hur bevacizumab påverkar cellernas överlevnad gjordes Alamar Blue-analys med både intakt och inkapslat bevacizumab. För att sterilisera proverna, filtrerades bevacizumab-lösningen med en spruta och 0,2 µm cellulosaacetat-filter (Whatman). För inhibering av bevacizumab blandades olika koncentrationer (0–1000 ng/ml) med 44 ng/ml av VEGF och inkuberades i två timmar vid +37 °C med 5 % CO<sub>2</sub>. Efter inkubationen tillsattes en cellsuspension ( $6 \times 10^3$  celler/brunn) och en lösning med bevacizumab och VEGF till brunnar. Plattan inkuberades i fyra dagar vid +37 °C med 5 % CO<sub>2</sub>. På fjärde dagen tillsattes 10 µl Alamar Blue-reagens till varje brunn och plattan inkuberades i sex timmar till vid +37 °C med 5 % CO<sub>2</sub>. Fluorescens mättes med 544/590 nm excitation/emission (Hidex sense). Protokollet var likadant för både intakt och inkapslat bevacizumab. I varje analys av bevacizumab-inhibering gjordes en kontrollanalys med VEGF i samma platta. Från fluorescens-värdena räknades IC<sub>50</sub>-värden, som är koncentrationen där bevacizumab inhiberar hälften av den maximala nivån. IC<sub>50</sub>-koncentration (ng/ml) inverterades till molaritet, vilket är den substansmängden av ett ämne som finns per volymenhet lösning. Standardenheten är molar (M) som är lika med mol per liter. IC<sub>50</sub>-värden räknades logaritmiskt.

## **4.6 Enzymkopplad immunadsorberande analys av bevacizumab**

### **4.6.1 Bindningsaktiviteten hos intakt bevacizumab**

För denna studie användes en Nunc MaxiSorp<sup>TM</sup> platta (Thermo Scientific) till vilken 30 ng/ml av VEGF tillsattes till varje brunn och plattan inkuberades över natten vid +4 °C. Följande dag tvättades brunnarna två gånger med fosfatbuffrad saltlösning (PBS, eng. phosphate buffered saline) med 0,05 % Tween20 (Sigma Aldrich) för att avlägsna alla antikroppar som inte bundits i botten av brunnarna. Plattan inkuberades i två timmar vid rumstemperatur i en skakare med blockerande buffert av PBS och 5 % bovint serumalbumin (BSA, eng. bovine serum albumin) (Sigma Aldrich). En blockerande buffert förhindrar ospecifik bindning av reaktanter i brunnarna. Efter inkuberingen tvättades brunnarna två gånger med tvättbuffert. En spädningsserie gjordes av bevacizumab. PBS med 1 % BSA användes för utspädning. Olika koncentrationer av bevacizumab (0–2400 ng/ml) tillsattes i brunnarna i två eller tre replikat och plattan inkuberades i en timme vid rumstemperatur i en skakare. Plattan tvättades igen två gånger med tvättbuffert. Därefter gjordes utspädning av den sekundära antikroppen som var en get anti-human IgG antikropp konjugerad med pepparrotsperoxidas (HRP, eng. horseradish peroxidase) (Merck). HRP-antikroppen pipetterades till brunnarna och inkuberades i trettio minuter vid rumstemperatur i en skakare. Efter inkuberingen tvättades plattan ytterligare två gånger med tvättbuffert. 3,3'-5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) (Sigma Aldrich) tillsattes i brunnarna och inkuberades under aluminiumfolie fem minuter. TMB detekterar HRP och framkallar en synlig färgreaktion. Reaktionen avbryts med svavelsyra. Absorbansen mättes inom femton minuter (Hidex Sense) och absorbansvärdena användes för att skapa en titreringskurva.

### **4.6.2 Bindningsaktiviteten hos degraderad bevacizumab**

För att kontrollera att den enzymkopplade immunadsorberande analysen (ELISA-analys) fungerade och visade skillnader i bindningsaktiviteten hos bevacizumab och för att testa dess stabilitet, gjordes ett experiment med degraderat protein. Intakt bevacizumab utspädes till koncentration 500 µg/ml och delades i fem eppendorfrör. Ett rör användes som kontrollprov och de andra rören inkuberades i rumstemperatur under ultraviolett (UV)-ljus i 15 minuter, 30 minuter, 1 timme eller 2 timmar. Efter UV-strålningen gjordes

ELISA-analys enligt samma protokoll som beskrivs nedan. Kontrollprovet som inte fått UV-strålning analyserades alltid i samma platta med bevacizumab som inkuberats med UV-ljus.

#### **4.6.3 Bindningsaktiviteten hos inkapslat bevacizumab**

Bindningsaktiviteten hos det inkapslade bevacizumabet analyserades med ELISA. Bevacizumab-proverna som analyserades var inkapslade i mikropartiklar eller i hydrogeldepot. Proverna dissolverades i 50 mM TRIS med 0,05 % tween80 (pH 7,4 vid +37 °C). Proverna analyserades med RP-HPLC efter upplösningen för att kontrollera koncentrationerna. Proverna upplöstes vid 22, 24, 48 och 72 timmar. Koncentrationerna av proverna visade hur mycket bevacizumab som hade dissolverats under den tid provet var under skakning och i vattenbad. SEC-HPLC gjordes för att kontrollera om bevacizumab hade aggregerat i lösningen. Efter mätningen av koncentrationen gjordes ELISA enligt protokollen som beskrivits tidigare. Koncentrationerna av bevacizumab var mellan 0–2400 ng/ml. En provserie med två replikat av intakt bevacizumab användes som kontrollprov i varje analys. Det inkapslade bevacizumabet hade tre replikat av varje koncentration. Från varje experiment räknades EC50-värden, som räknades likadant logaritmiskt som räkningen av IC50-värden vid överlevnadsanalys.

#### **4.7 Statistisk analys**

Resultaten analyserades med programmet GraphPad Prism 8.3.1. Resultaten analyserades med t-test när två grupper undersöktes. När tre eller flera grupper undersöktes analyserades resultaten med "One-Way Anova" eller "Two-Way Anova". Resultaten anges som medeltal + medelvärdets medelfel (SEM) och p-värdet. P-värdet under 0,05 anses som statistiskt signifikant, medan p-värdet över 0,05 anses som icke-signifikant. I figurerna representerar symbolerna ns ett p-värde  $\geq 0,05$ , \* ett p-värde  $\leq 0,05$ , \*\* ett p-värde  $\leq 0,01$ , och \*\*\* ett p-värde  $\leq 0,001$ .

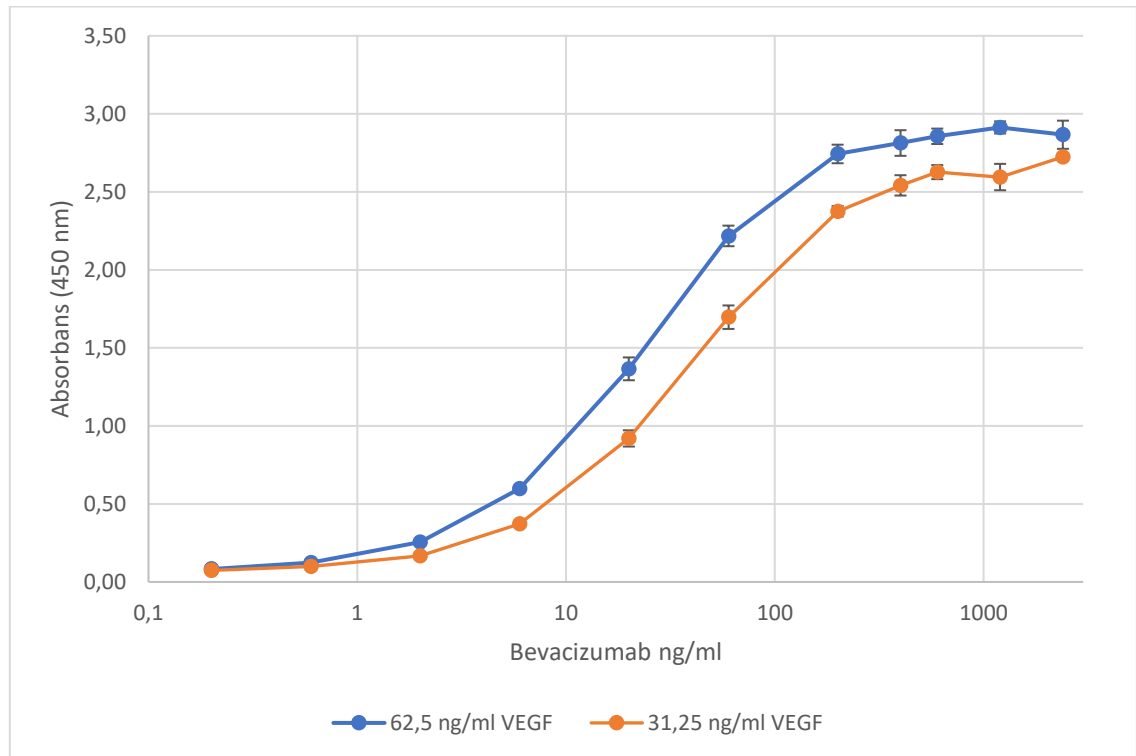
## 5 RESULTAT

### 5.1 Optimering av ELISA-analys

I början av detta projekt optimerades protokollet för att analysera bindningsaktiviteten hos bevacizumab med en ELISA-metod. Ändamålet med optimeringen var att kontrollera att olika ämnen som finns i lösningar inte förstör ELISA-analysen. Syftet var också att optimera koncentrationer av VEGF och bevacizumab i analysen såväl som utspädningen av sekundära antikroppen konjugerad med HRP.

#### 5.1.1 Optimering av VEGF-koncentration

För att välja koncentrationen av VEGF som användes i ELISA-analyser, gjordes en ELISA-analys med intakt bevacizumab. I en 96-brunnars platta tillsattes två olika koncentrationer av VEGF: 62,5 ng/ml och 31,25 ng/ml och bevacizumab provserie med 12 prover med olika koncentrationer (0–2400 ng/ml). Plattan analyserades med Hidex-analysator som mätte absorbansen. Enligt resultaten valdes den lägre koncentrationen av VEGF för protokollen och den ändrades senare till jämt 30 ng/ml. Resultaten visar att en VEGF-koncentration på 31,25 ng/ml är tillräckligt mycket för bevacizumab att binda till VEGF. Den maximala nivån av absorbansen som Hidex-analysatorn pålitligt kan mäta är 3,0 (Figur 9). Den högre koncentrationen av VEGF gav signaler som var för nära den maximala nivån, vilket stöder valet av den lägre VEGF-koncentrationen.

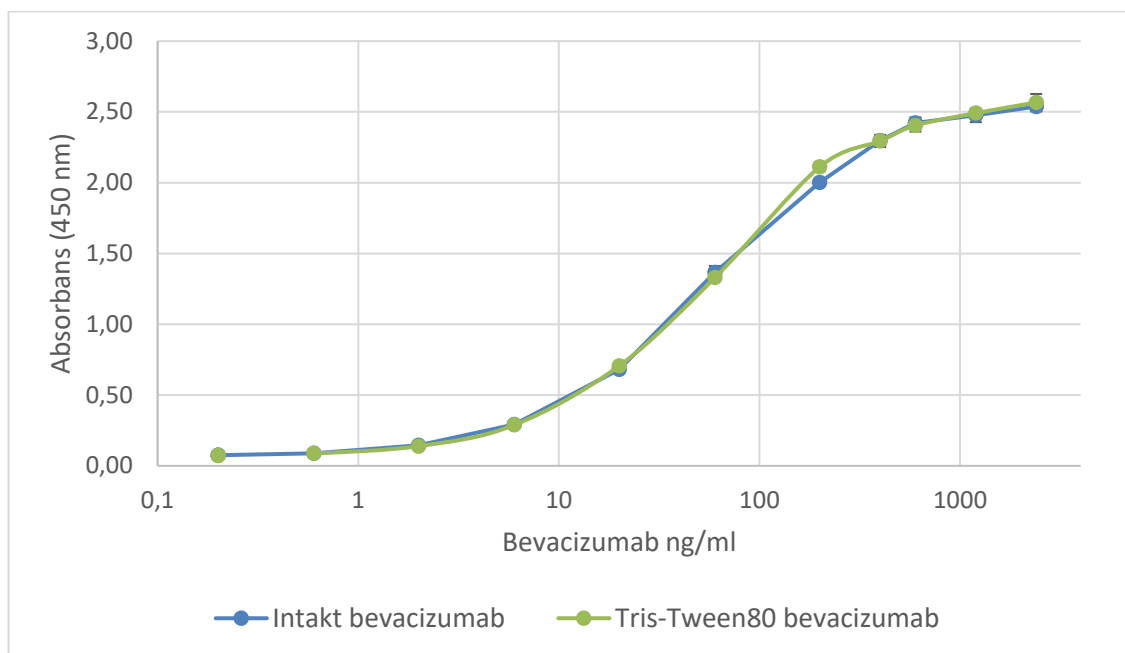


Figur 9. En graf av absorbansvärdena från ELISA-analys. En 96-brunnars platta inkuberades med två olika koncentrationer av VEGF (62,5 ng/ml och 31,25 ng/ml). 12 olika koncentrationer (0–2400 ng/ml) av bevacizumab pipetterades till båda plattorna med de olika VEGF-koncentrationerna med fyra replikat. Experimenten gjordes en gång.

### 5.1.2 Påverkan av Tris-Tween80 på bevacizumab

Eftersom Tris-buffert med 0,05% tween80 används när bevacizumab upplöses från mikropartiklarna kontrollerade vi om denna buffert påverkar förmågan hos bevacizumab att binda till VEGF. En kontrollserie gjordes med intakt bevacizumab med olika koncentrationer (0–2400 ng/ml). Utspädningen gjordes med 1xPBS med 1% BSA. Provserien gjordes med intakt bevacizumab. Koncentrationerna var samma som i kontrollserien men utspädningen från bevacizumab-baslösningen till en koncentration på 3,2 µg/ml gjordes med Tris med 0,05% tween80. Resten av utspädningarna gjordes med 1xPBS med 1% BSA. Resultaten mättes med Hidex och absorbansvärdena användes för att rita en graf (Figur 10). Experimenten upprepades två gånger. Resultaten indikerar att Tris-bufferten med 0,05% tween80 inte påverkar bindningsförmågan hos bevacizumab till VEGF.





Figur 10. Optimering av ELISA-protokoll för att kontrollera att Tris-Tween80-buffert inte påverkar bindningsaktiviteten hos bevacizumab. I provserien har bevacizumab-baslösningen blivit utspädd med Tris med 0,05% tween80 till en koncentration på 3,2 µg/ml. Koncentrationerna av bevacizumab var mellan 0–2400 ng/ml. Koncentrationerna i kontrollprovet analyserades med tre replikat medan proverna med Tris-Tween80-buffert analyserades med två replikat. Experimenten upprepades två gånger.

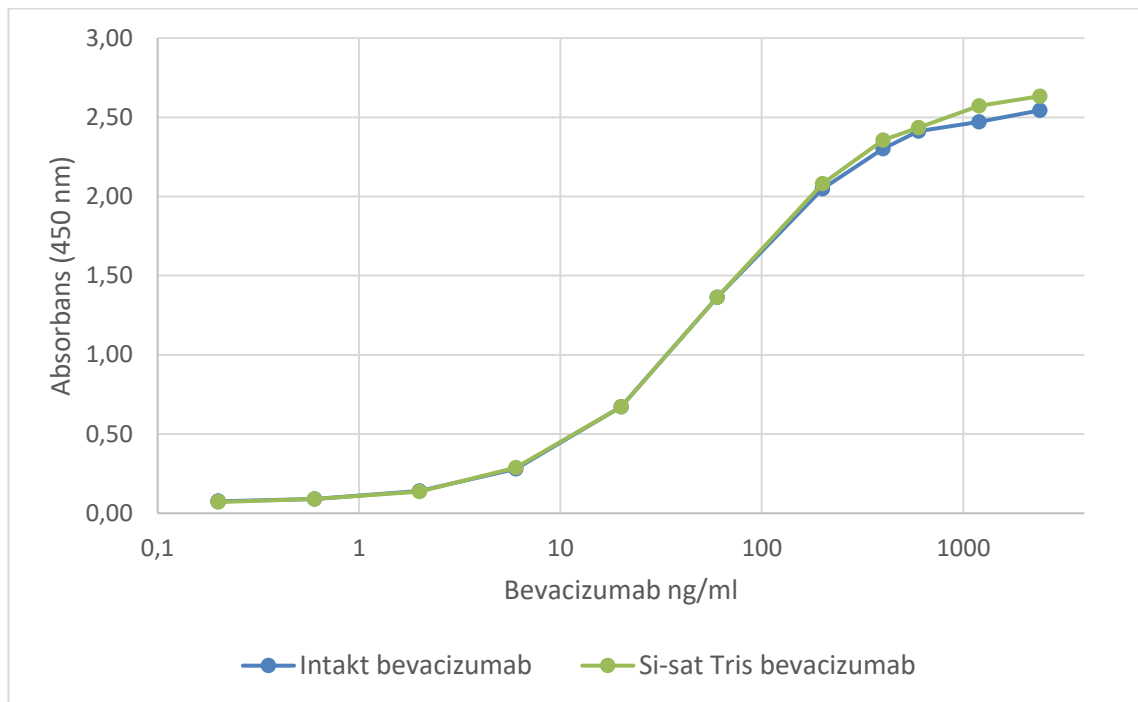
### 5.1.3 Påverkan av kiseldioxid-mättad Tris på bevacizumab

Vid inkapslingsprocessen av proteiner används Tris-buffert som är mättad med kiseldioxid (Si-sat Tris). Koncentrationen av kiseldioxid i bufferten är runt 30 ppm (antal per miljon, eng. parts per million), vilket också användes i provserien. För att kontrollera om kiseldioxid påverkar bindningsaktiviteten hos bevacizumab gjordes en ELISA-analys. Analysen gjordes med en kontrollserie av intakt bevacizumab med 12 prover med olika koncentrationer mellan 0–2400 ng/ml som utspäddes med 1xPBS med 1% BSA. Bufferten till provserien gjordes genom att späda ut 125 ppm kiseldioxid-mättad TRIS-buffert med 1xPBS med 1% BSA. För att undersöka om kiseldioxid påverkar bindningsaktiviteten hos bevacizumab användes intakt bevacizumab. Bevacizumab-proverna utspäddes till en koncentration på 3,2 µg/ml med 1xPBS med 1% BSA som innehöll 30 ppm av kiseldioxid-mättad TRIS-buffert. Resten av bevacizumabets utspädningar gjordes som vanligt med 1xPBS med 1% BSA. Både kontrollserien och provserien tillsattes i 96-plattans brunnar i tre replikat (Figur 11). Koncentrationerna av bevacizumab i provserien var mellan 0–2400 ng/ml.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	2400 ng/ml	1200 ng/ml	600 ng/ml	400 ng/ml	200 ng/ml	60 ng/ml	20 ng/ml	6 ng/ml	2 ng/ml	0,6 ng/ml	0,2 ng/ml	0 ng/ml	Intakt bevaci- zumab
<b>B</b>	2400 ng/ml	1200 ng/ml	600 ng/ml	400 ng/ml	200 ng/ml	60 ng/ml	20 ng/ml	6 ng/ml	2 ng/ml	0,6 ng/ml	0,2 ng/ml	0 ng/ml	
<b>C</b>	2400 ng/ml	1200 ng/ml	600 ng/ml	400 ng/ml	200 ng/ml	60 ng/ml	20 ng/ml	6 ng/ml	2 ng/ml	0,6 ng/ml	0,2 ng/ml	0 ng/ml	
<b>D</b>	2400 ng/ml	1200 ng/ml	600 ng/ml	400 ng/ml	200 ng/ml	60 ng/ml	20 ng/ml	6 ng/ml	2 ng/ml	0,6 ng/ml	0,2 ng/ml	0 ng/ml	Si-sat Tris bevaci- zumab
<b>E</b>	2400 ng/ml	1200 ng/ml	600 ng/ml	400 ng/ml	200 ng/ml	60 ng/ml	20 ng/ml	6 ng/ml	2 ng/ml	0,6 ng/ml	0,2 ng/ml	0 ng/ml	
<b>F</b>	2400 ng/ml	1200 ng/ml	600 ng/ml	400 ng/ml	200 ng/ml	60 ng/ml	20 ng/ml	6 ng/ml	2 ng/ml	0,6 ng/ml	0,2 ng/ml	0 ng/ml	

Figur 11. Pipetteringskarta. Utspädningen av kontrollserien (intakt bevacizumab) gjordes med 1xPBS med 1% BSA. Bevacizumab-provserien späddes ut med kiseldioxid-mättad Tris-buffert. Alla koncentrationer gjordes med tre replikat och olika koncentrationer (0–2400 ng/ml).

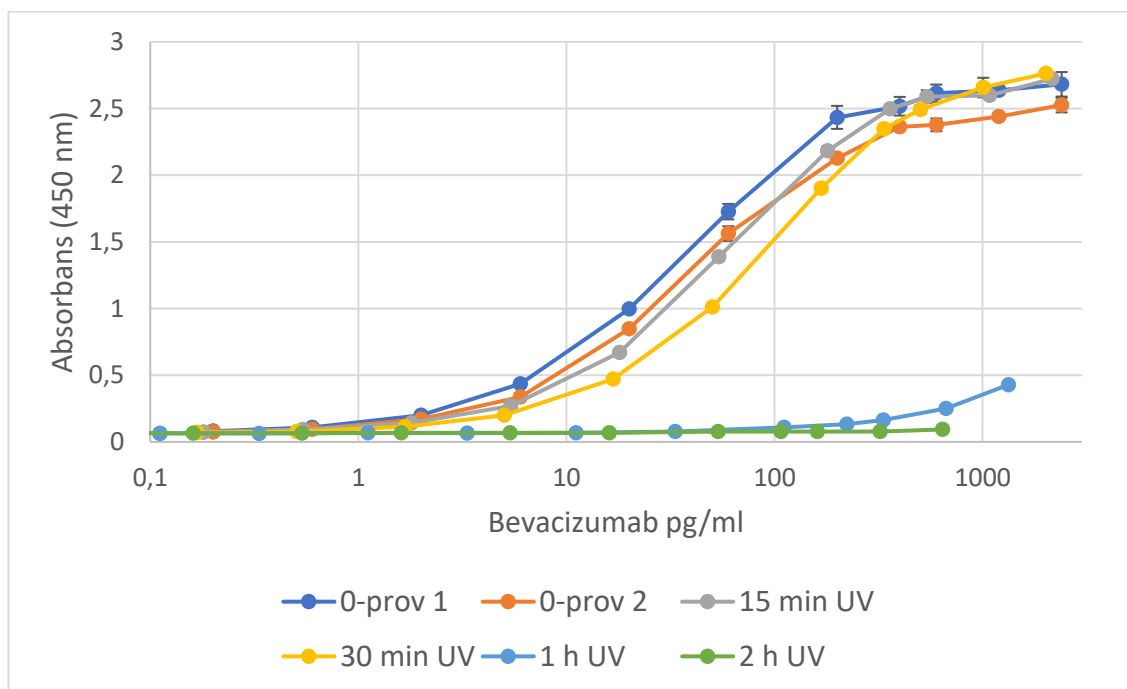
ELISA-experimenten upprepades två gånger. Grafen av resultaten visar att kiseldioxid inte påverkar bindingsaktiviteten hos bevacizumab (Figur 12). Enligt resultaten kunde man härleda att ELISA-protokollen kan användas med det inkapslade bevacizumabet som innehåller Tris-tween80 och kiseldioxid-mättad Tris-buffert.



Figur 12. Fortsatt optimering av ELISA-protokoll. I provserien testades det om Tris-buffert mättad med kiseldioxid påverkar bevacizumabets bindningsförmåga till VEGF. Olika bevacizumab-koncentrationer var mellan 0–2400 ng/ml. Både kontrollserien och provserien analyserades med tre replikat. Experimenten upprepades två gånger.

#### 5.1.4 Detektion av bindningsaktiviteten med ELISA

För att kontrollera om ELISA-analys kunde användas i vår undersökning, gjordes två ELISA-analyser: en med intakt bevacizumab och en med bevacizumab vilkets förmåga att binda till VEGF hade förstörts. Målet var att förstöra proteinets bindningsaktivitet men utan att genast bryta ner hela proteinet och för detta valdes ultraviolett (UV) strålning (Signorello et al., 2014). Intakt bevacizumab exponerades för UV-strålning i 15 minuter, 30 minuter, en timme och två timmar och bindningsaktiviteten hos bevacizumab mättes efter exponeringen. I ena 96-brunnars plattan analyserades proverna som exponerats i 15 och 30 minuter och i den andra plattan var proverna som varit under UV-strålning i en timme och två timmar (Figur 13). En kontrollserie med bevacizumab som inte exponerats för UV-strålning inkluderades i båda plattorna. Koncentrationerna av bevacizumab i proverna var mellan 0–2400 ng/ml. Resultaten antyder att bevacizumab förlorar dess förmåga att binda till VEGF efter att proteinet har exponerats för UV-strålning.



Figur 13. Kontrollanalys för att testa om ELISA-analysen visar skillnader mellan det intakta proteinet och proteinet med minskad bindningsaktivitet. En kontrollserie med intakt bevacizumab jämfördes med bevacizumabet som exponerats för UV-strålning i 15 och 30 minuter eller i en timme och två timmar. Kontrollserien analyserades med två replikat medan provserierna analyserades med tre replikat. Experimenten gjordes en gång.

Kortare exponering (15 och 30 minuter) av UV-strålning minskar synligt bindningsaktiviteten i koncentrationer 6–200 ng/ml men vid högre koncentrationer kan bevacizumab binda till VEGF. Lång exponering med UV-strålning förstör bindningsaktiviteten i stort sett. Koncentrationerna av bevacizumab kontrollerades med RP-HPLC. Resultatet visade att vid längre exponering för UV-strålning började proteinet degraderas och i RP-HPLC var koncentrationerna signifikant lägre än vad det hade varit före UV-exponeringen.

Från varje bindningsanalys räknades EC<sub>50</sub>-värden, vilket visar koncentrationen av provet när det har nått hälften av det maximala absorbans-värdet (eng. half maximal effective concentration) och detta används ofta för att mäta läkemedlets effektivitet. Resultaten jämfördes med kontrollprovet i samma 96-brunnars platta för att få ett procentuellt värde av skillnaderna i bindningsaktiviteten (Tabell 1). EC<sub>50</sub>-värden visar att bindningsaktiviteten hos bevacizumabet börjar tydligt minska redan efter 15 minuters

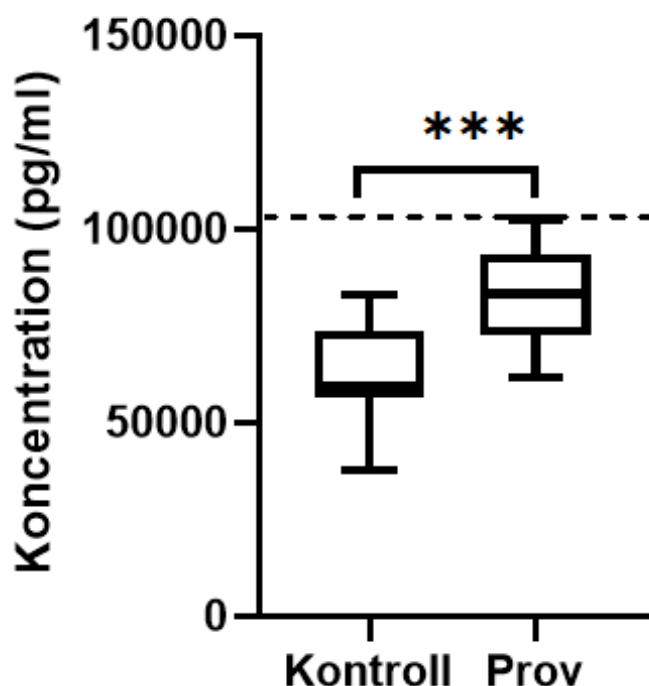
exponering för UV-strålning. I proverna som har exponerats för UV-strålning i en timme eller längre finns det ingen bindningsaktivitet kvar.

Tabell 1. EC50-värden från proverna som exponerats för UV-strålning. EC50-värdena beskriver koncentrationer av bevacizumab där absorbansen är hälften av det maximala värdet. Sista kolumnen visar procentandelen från bindningsaktiviteten hos bevacizumab jämfört med kontrollserien (proverna som inte exponerats för UV-strålning). Resultaten visar tydligt att UV-strålning minskar bindningsaktiviteten hos bevacizumab redan efter 15 minuter.

PROV	EC50 konc. (ng/ml), intakt	EC50 konc. (ng/ml), inkapslad	EC50 (prov/kontroll)
15 min UV	37,7	58,1	65 %
30 min UV	37,7	116,5	32 %
1 h UV	43,6	0,0	0 %
2 h UV	43,6	0,0	0 %

## 5.2 Bindningsaktiviteten hos inkapslat bevacizumab och kontrollprovet

För att undersöka om det fanns en skillnad i bindningsaktiviteten hos det intakta och det inkapslade bevacizumabet inkluderades en kontrollserie i varje ELISA-analys och resultaten jämfördes med inkapslat bevacizumab. Från varje prov räknades EC50-värden. En maximalnivå av EC50-koncentrationer räknades från medelvärdet av kontrollproverna, vilket visar att inkapslat bevacizumab uppvisar jämförbara resultat med kontrollproven. EC50-värden analyserades för att se om det fanns signifikanta skillnader i bindningsaktiviteten mellan kontrollproverna och det inkapslade bevacizumabet (Figur 14). Resultaten visar att det inkapslade bevacizumabet har ett signifikant högre medelvärde i EC50-värdena än kontrollproven ( $p < 0,001$ ).

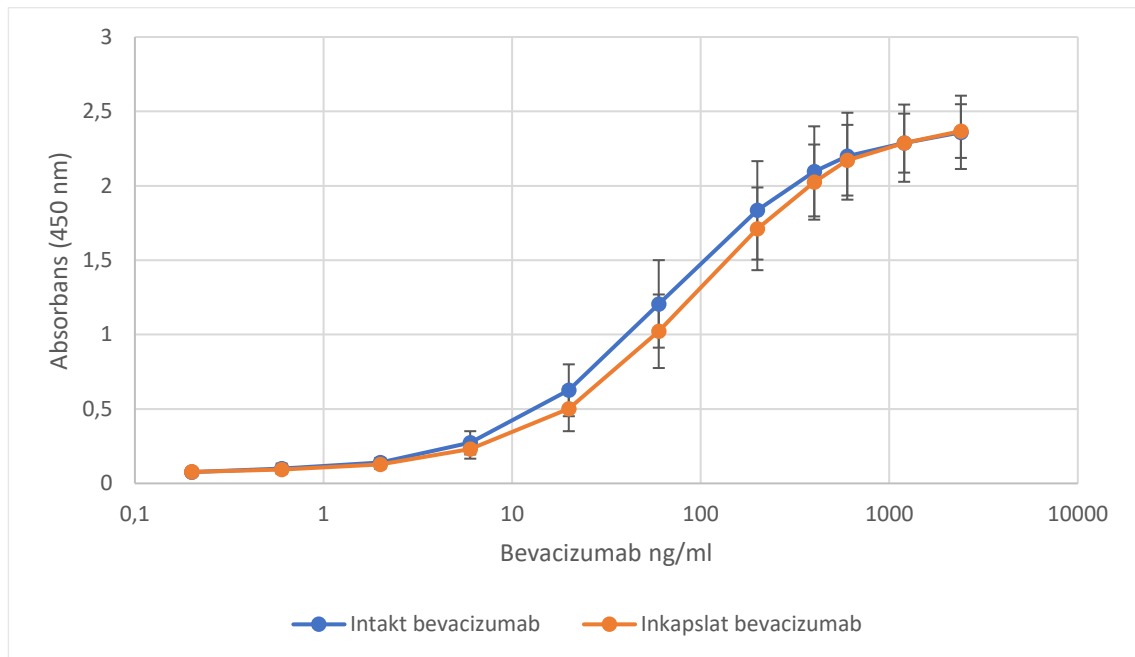


Figur 14. Koncentrationer av EC50-värdena i kontrollproverna och proverna med inkapslat bevacizumab. En horisontal streckad linje representerar den maximala acceptabla nivån för att det inkapslade bevacizumabet kan jämföras med kontrollproven. Statistisk analys gjordes med t-test. Signifikansen anges med \*\*\*. Resultaten anges som maximal och minimal, medelvärde + SEM (n=15).

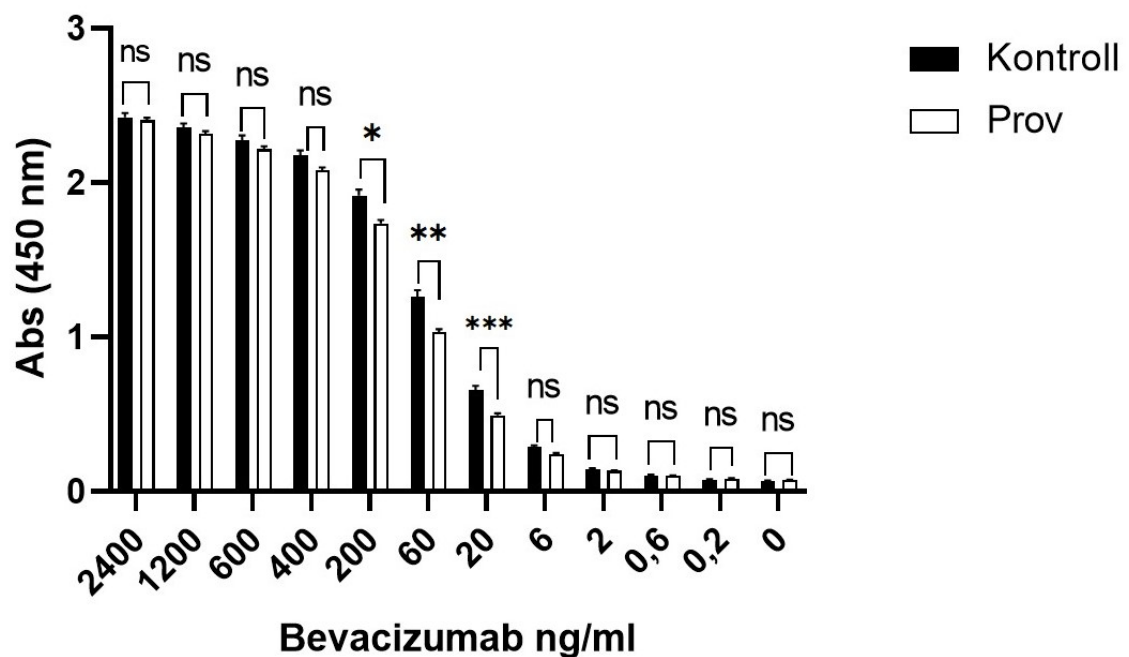
### 5.3 Bevacizumabets inkapsling och bindningsaktivitet

Vid varje ELISA-analys undersöktes det inkapslade bevacizumabet och resultaten jämfördes med en provserie med intakt bevacizumab. Koncentrationerna av bevacizumab i både kontroll- och provserien var mellan 0–2400 ng/ml. Absorbansen mättes vid 450 nm med Hidex-analysator. Bindningsaktiviteten jämfördes mellan kontroll- och provserien. Grafen (Figur 15 A) visar riktgivande resultat hos bindningsaktiviteten med det inkapslade bevacizumabet jämfört med kontrollprovet. Medeltalet från varje koncentration från alla experimenten har räknats i grafen. Resultaten (Figur 15 B) visar att inkapslat bevacizumab upprätthåller bindningsaktiviteten till VEGF efter det har upplösts från kiseldioxidmikropartiklar. Koncentrationerna utanför 20–200 ng/ml visar inte signifikanta skillnader hos bindningsaktiviteten mellan kontrollproven och inkapslat bevacizumab.

A)

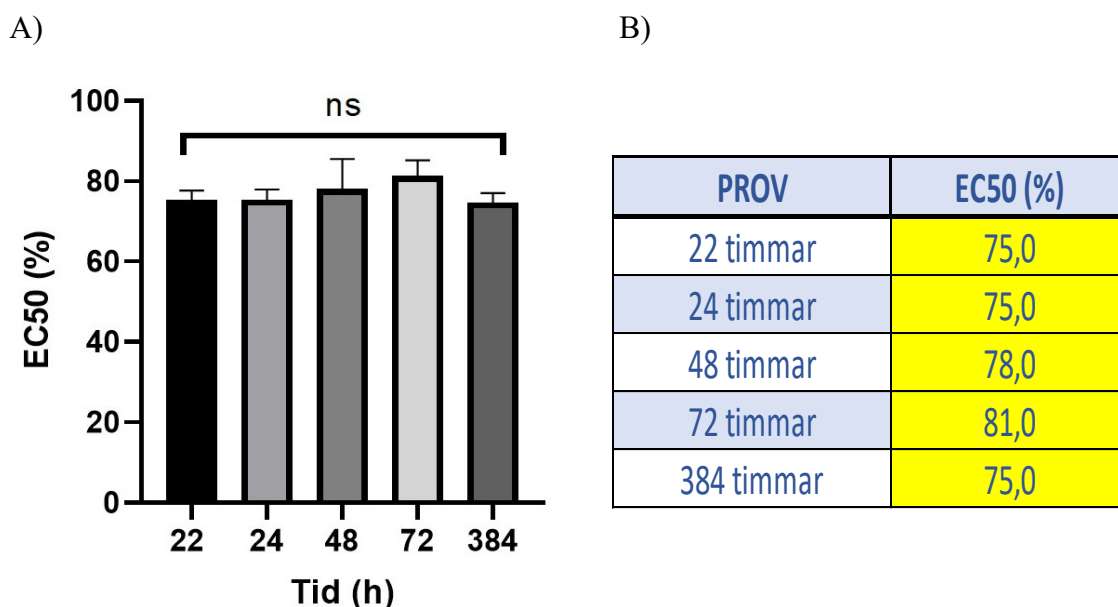


B)



Figur 15. A) En graf från ELISA-analys. Den visar medeltalet från varje koncentration från alla experimenten. Grafen visar riktigivande resultat hos bindningsaktiviteten med kontrollprovet (intakt bevacizumab) och med inkapslat bevacizumab. B) Kvantifierat bindningsaktivitet. Signifikansen anges med ns, \*, \*\* eller \*\*\*. Resultaten anges som medelvärde + SEM (n=15)

För att analysera bindningsaktiviteten mer specifikt räknades EC50-värden från varje experiment och resultaten jämfördes med kontrollprovet från samma experiment (Figur 16 A). ELISA-analys gjordes med sex olika bevacizumab-formuleringar där parametern vid inkapslingsprocessen var olika. Bevacizumab upplöstes från kiseldioxidmikropartiklar vid 22, 24, 48 och 72 timmar. Olika upplösningstider visar inte signifikanta skillnader i bindningsaktiviteten. Figur 16 B visar procentandelen hos bindningsaktiviteten hos inkapslat bevacizumab jämfört med kontrollproven. Resultaten visar att det inkapslade bevacizumabet upprätthåller 75–81 % av bindningsaktiviteten jämfört med det intakta bevacizumabet. Bindningsaktivitet hos det inkapslade bevacizumabet undersöktes ytterligare med ett prov där bevacizumab upplöstes i 384 timmar. Detta prov hade blivit upplöst med en simuleringsmetod som simulerar omständigheterna kring vätskeflödet i människans öga. För detta prov hade kiseldioxidmikropartiklar formulerats så att de degraderades långsamt. ELISA-analys upprepades tre gånger med samma bevacizumab-prov (Figur 16 A och B). Resultaten stöder hypotesen att bevacizumab hålls funktionellt aktiv i kiseldioxidmikropartiklar under längre tidsperioder.



Figur 16. A) EC50-värdena av det inkapslade bevacizumabet jämfört med kontrollprovet. Tiden (h) beskriver hur länge bevacizumabet blivit upplöst. EC50-koncentrationerna av varje inkapslat prov jämfördes med EC50-koncentrationerna med kontrollprovet. Resultaten anges som procentandelen från bindningsaktiviteten hos inkapslat bevacizumab jämfört med kontrollserien med medelvärde + SEM (n=3). Signifikansen anges med ns. B) Procentandelen för bindningsaktiviteten hos inkapslat bevacizumab jämfört med kontrollproverna.



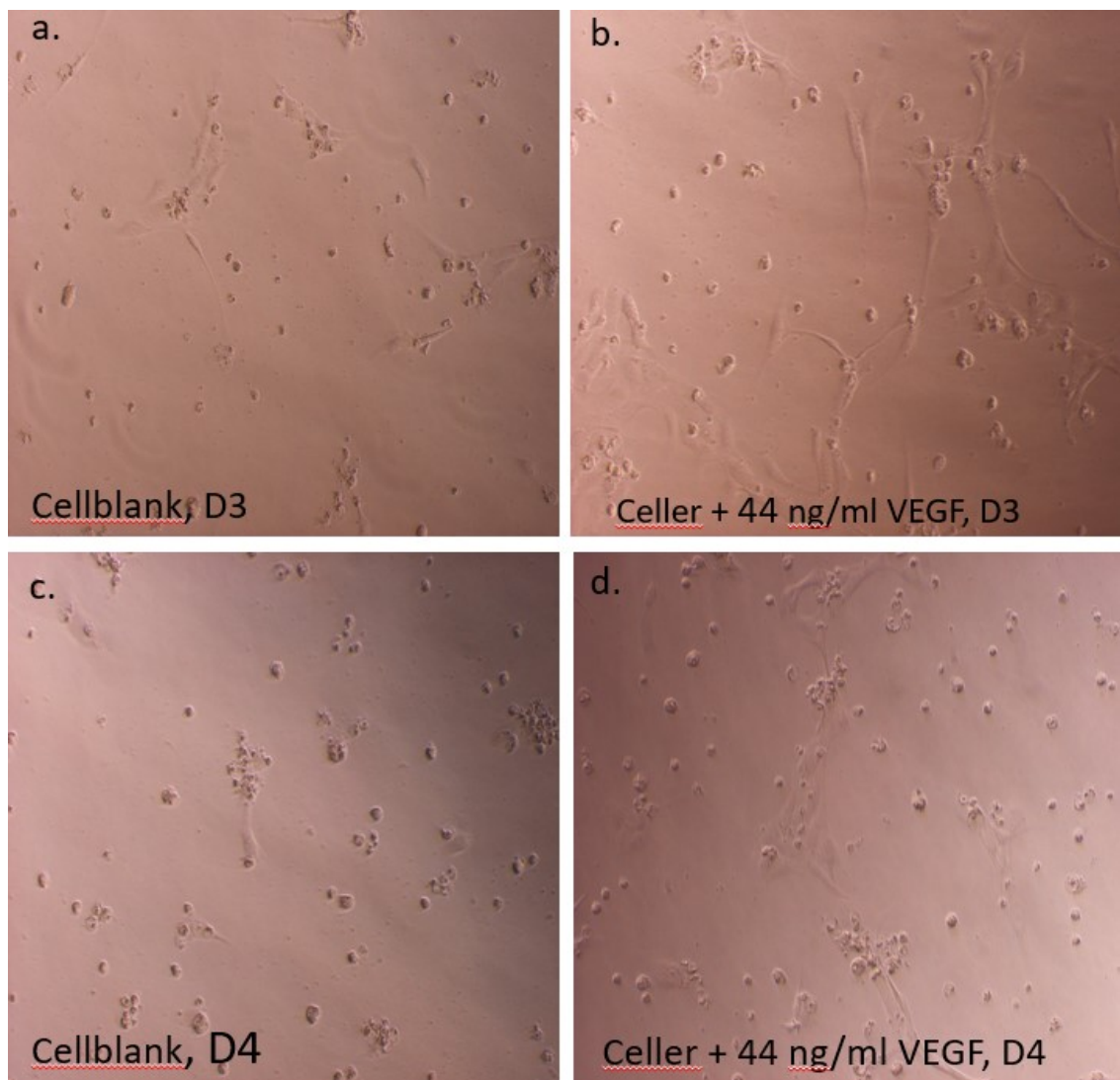
## 5.4 Etablering av överlevnadsanalys

### 5.4.1 Optimering av antalet celler och inkuberingstider

För överlevnadsanalysen valdes HUVEC-celler och för cellkulturerna var antalet celler  $1 \times 10^4$  celler per brunn, vilket var baserat på tidigare studier (Wang et al., 2004). Efter några analyser ändrades cellantalet till  $6 \times 10^3$ ; valet att använda ett lägre antal celler berodde på att med fler celler blev fluorescens-signalen för hög. Cellerna inkuberades med enbart VEGF och VEGF med bevacizumab vid +37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> i fyra dagar. Längre inkuberingstider skulle kunna leda till att cellerna inte längre är livsdugliga eftersom cellkultur-mediet inte innehöll några näringsämnen. Mängden av Alamar Blue-reagens i studierna var 25 µl (Wang et al., 2004) men efter några experimenten sänktes det till 10 µl per brunn av reagens på grund av en stor bakrundssignal av endast Alamar Blue-reagens. Cellerna med reagens inkuberades vid +37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> i sex timmar. Inkuberingstider valdes utifrån tidigare studier (Wang et al., 2004).

## 5.5 Mikroskopering av HUVEC-celler

Varje brunn med endast cellsuspension, cellsuspensionen med olika koncentrationer av VEGF och cellsuspensionen med en standard koncentration av VEGF och olika koncentrationer av bevacizumab mikroskoperades varje dag under fyra dagar. Cellkulturen med VEGF (Figur 17 b) och kontrollcellerna (Figur 17 a) visade ha mera celler efter tre dagar än vad de hade efter fyra dagar. Större skillnader med fluorescensvärden nåddes i överlevnadsprovet efter fyra dagar. Det berodde på att kontrollcellerna (Figur 17 c) gav mindre respons med Alamar Blue-reagens.



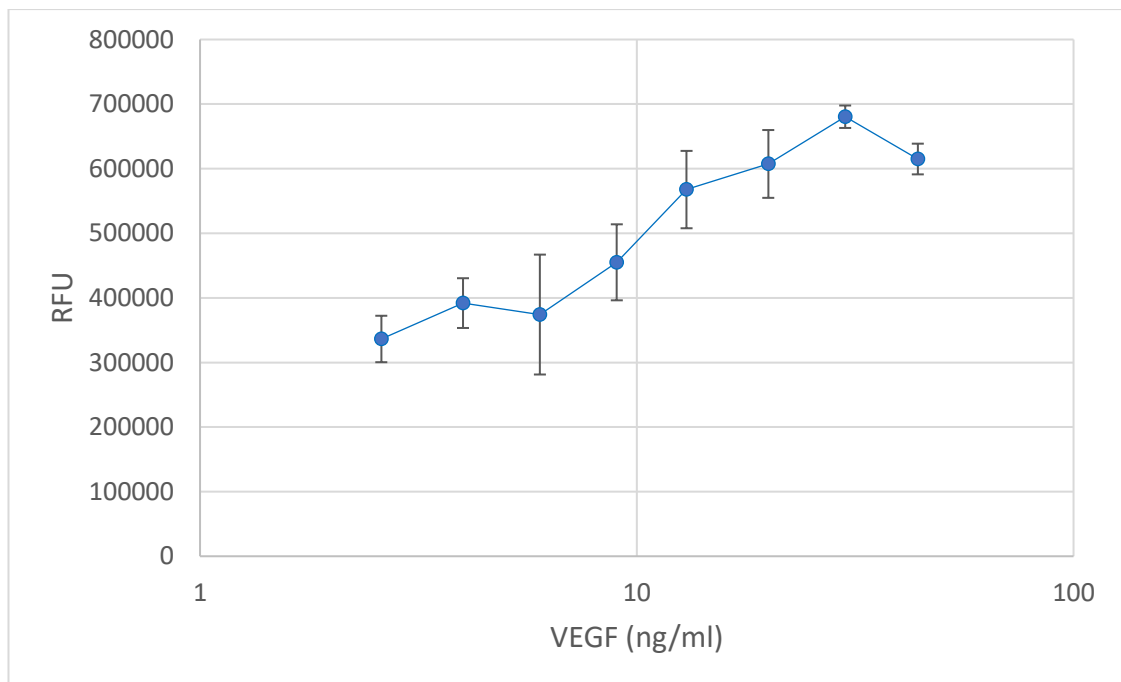
Figur 17. Bilder på kontrollprovet med endast cellsuspension (a. och b.) och med 44 ng/ml tillsatt VEGF i cellsuspensionen (c. och d.). Cellerna med VEGF har bättre livsduglighet efter tre dagar såväl som kontrollcellerna. En större skillnad nåddes i överlevnadsanalys efter fyra dagars inkubering. D: antal dagar i cellkultur.

## 5.6 Cellernas överlevnad vid tillsats av VEGF

Målet med överlevnadsanalysen var att undersöka om bevacizumab kan binda till VEGF i cellkultur. För detta krävdes det att vi hade resultat om hur VEGF påverkade cellerna. Studier har visat att VEGF förbättrar cellernas proliferations- och överlevnadsförmåga (Domigan et al., 2015). VEGF tillsattes i cellsuspensionen i början av experimenten.

### 5.6.1 Ökad överlevnad och proliferation i cellkultur

För att undersöka vilken effekt VEGF hade i HUVEC-celler tillsattes koncentrationer mellan 0–100 ng/ml. Punkterna i Figur 18 representerar enskilda koncentrationerna av VEGF i överlevnadsanalysen. Olika koncentrationer användes för att studera hur mycket VEGF det krävdes för att se en skillnad i överlevnaden. Med medium och utan tillsatta näringsämnen och VEGF börjar cellerna förlora sin metaboliska aktivitet efter flera dagars inkubering. Efter tillsats av Alamar Blue-reagens mättes fluorescens för varje prov. Medelvärden av signalerna från kontrollprovet (celler med medium utan näringsämnen) användes som kontrollprov. En brunn med endast medium utan celler användes som blank-signal och denna värde subtraherades från signalerna i VEGF-proven. Resultatet stöder tidigare studier att VEGF ökar cellernas proliferation (Figur 18).

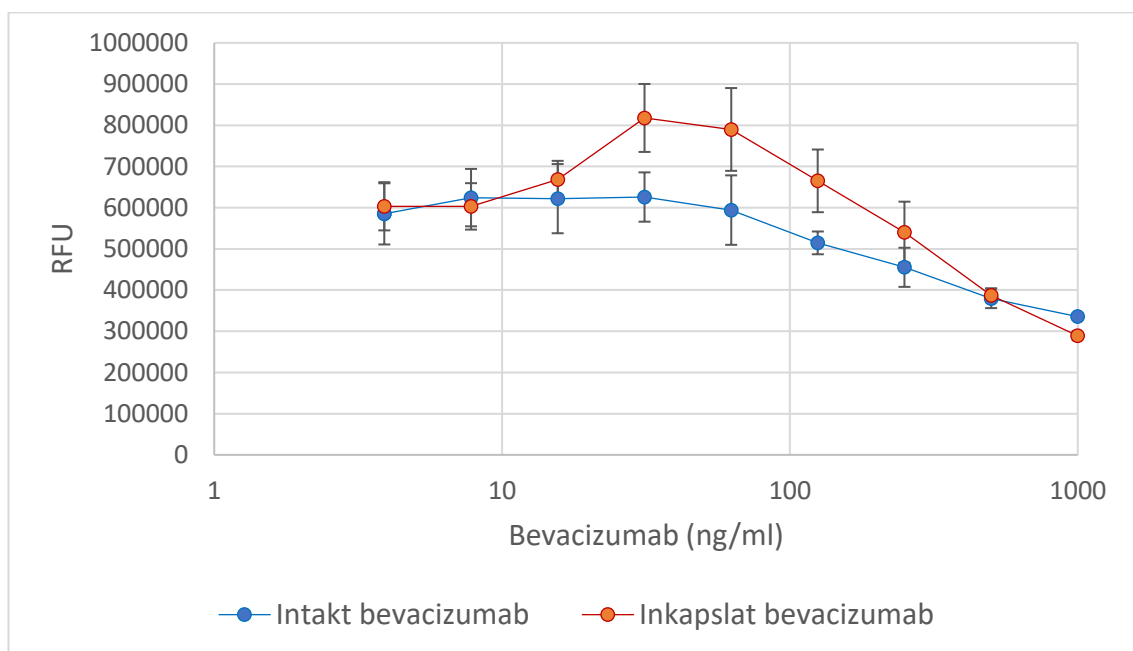


Figur 18. Överlevnadsanalys med Alamar Blue-reagens för att studera hur tillsats av VEGF i cellsuspensionen påverkar HUVEC-cellernas metaboliska aktivitet och överlevnad. Cellerna inkuberades i fyra dagar. Cellerna med Alamar Blue-reagens inkuberades i sex timmar. Varje punkt representerar medelvärdet av tre replikat. Resultaten anges som medelvärdet + SD. RFU: Relativ fluorescens-enhet (eng. relative fluorescence unit).

## 5.7 Det inkapslade bevacizumabet inhiberar VEGF i levande celler

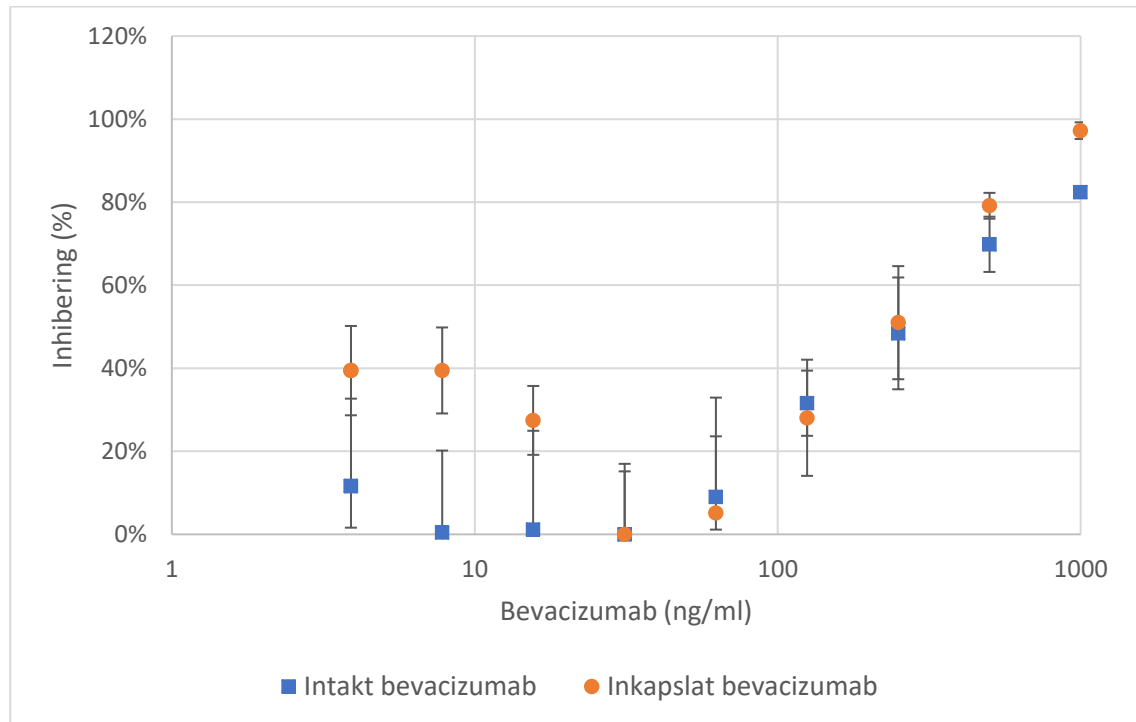
Härnäst undersöktes det om det inkapslade bevacizumabet kunde inhibera VEGF i HUVEC-celler. Olika koncentrationer av bevacizumab blandades med VEGF och dessa

lösningar inkuberades i två timmar före tillsättning i cellsuspensionen. I varje överlevnadsanalys gjordes en kontrollserie med intakt bevacizumab och resultaten jämfördes med det inkapslade provet. I analysen mättes fluorescens-värden (Figur 19). Provet med VEGF i cellerna gjordes samtidigt i varje analys tillsammans med prover som innehöll både VEGF och bevacizumab. Resultaten antyder att bevacizumabet blockerade överlevnadsaktiviteten av VEGF på ett koncentrationsberoende sätt. Det inkapslade bevacizumabet ger högre signaler än kontrollprovet men båda proverna visar ha en respons med VEGF i HUVEC-celler.



Figur 19. Överlevnadsanalys för att studera påverkan av bevacizumab i levande celler. Lösning med VEGF och bevacizumab pipetterades i varje brunna med HUVEC-celler. Efter fyra dagars inkubering tillsattes Alamar Blue-reagens och fluorescens mättes. Figuren visar en representativ analys av överlevnad med intakt bevacizumab som kontrollprov och det inkapslade provet. Varje Både kontrollserien och det inkapslade bevacizumabet analyserades med tre replikat. Resultaten anges som medelvärde + SD.

Från resultaten av cellernas överlevnadsanalys med både intakt och inkapslat bevacizumab räknades procentuell inhibering. Det högsta fluorescens-värdet räknades som noll-respons i inhibering och inhiberingsprocent räknades för alla koncentrationer av bevacizumab (Figur 20). Resultaten stöder hypotesen att bevacizumab kan inhibera effekten av VEGF i cellkultur. Inkapslat bevacizumab visar ha en inhiberande påverkan för HUVEC-celler.



Figur 20. Inhiberingen av VEGF i HUVEC-celler. Det intakta bevacizumabet fungerade som kontrollprov och resultaten mellan kontrollprovet och det inkapslade bevacizumabet jämfördes. Figuren ger riktgivande resultat hur effektivt olika koncentrationer av bevacizumab kan inhibera VEGF. Resultaten anges som medelvärde + SD.

Från resultaten av överlevnadsanalysen räknades IC<sub>50</sub>-värden. IC<sub>50</sub> används för att mäta läkemedlets förmåga att hämma en specifik biologisk eller biokemisk uppgift. IC<sub>50</sub> är ett kvantitativt mått som indikerar hur mycket av en viss hämmande substans som behövs för att inhibera en biologisk komponent eller process med 50 % (Brody, 2018). Resultaten från en experiment gav en IC<sub>50</sub> av 1,75 nM för kontrollprovet och 1,48 nM för inkapslat bevacizumab.

## 6 DISKUSSION

Syftet med detta arbete var att undersöka ifall inkapslingen i kiseldioxidmikropartiklar påverkar den funktionella aktiviteten hos bevacizumabet, som är ett anti-VEGF-läkemedel. Hypotesen var att inkapslingen i kiseldioxidmikropartiklar tillfälligt skyddar bioterapeutiska proteiner och att de då kan frisättas på ett kontrollerat sätt. Den funktionella aktiviteten hos bevacizumabet undersöktes genom läkemedlets bindningsaktivitet till VEGF. Studier fortsatte med *in vitro*-undersökningar för att kontrollera den biologiska aktiviteten hos bevacizumabet.

### 6.1 Kiseldioxidmikropartiklar i långtidsverkande läkemedelsleverans

Vanliga läkemedelsleveranssystem som tabletter, kapslar och lösningar är fortfarande de mest använda sätten att administrera läkemedel. Sådana formuleringar uppvisar flera fördelar såsom full kontroll av beredningsprocesser och effektivitet. Emellertid, observeras problem med stabilitet, absorption och *in vivo*-aktivitet som är begränsad till läkemedlets fysikalisk-kemiska egenskaper. Dessutom kan det inte riktas mot specifika vävnader eller celler. På grund av dessa skäl är inkapsling en intressant metod för läkemedelsleverans (Martínez Rivas et al., 2017).

Potentialen i sol-gel-inkapsling med kiseldioxid ligger i de mångsidiga möjligheterna att justera strukturen med hjälp av alkoxider och med korrekt användning av vatten i olika faser av processen. Med sol-gel-metoden kan API frisättas på ett kontrollerat sätt. Fördelarna är att kiseldioxidstrukturen kan bearbetas för att nå varierande degraderingshastighet och fördelaktiga omständigheter även för känsliga föreningar (Jokinen et al., 2008). Kiseldioxidbaserade mikropartiklar anses vara miljövänliga och ekonomiskt billiga eftersom kostnaderna vid tillverkning är låga (Ashraf et al., 2015).

En begränsning vid inkapslingen med sol-gel-kiseldioxid är att de inte verkar vara någon enhetlig strategi som kan tillämpas för inkapsling av alla enzymer (Tak Yip et al., 2009). Studier har gjorts med inkapslade celler. Även om inkapslingen har undersökts med olika celltyper under två decennier, kvarstår flera utmaningar för att en optimal inkapsling av olika celler ska uppnås. Studier indikerar till exempel att flera okända eller icke

karaktäriserade proteiner uppregleras som resultat av inkapslingen (Dickson och Ely, 2013).

## **6.2 Inkapslat bevacizumab upprätthåller dess funktionella aktivitet**

Nya blodkärl bildas vid flera okulära sjukdomar såsom AMD. En av de viktigaste faktorerna som inducerar bildning av nya blodkärl är VEGF. Anti-VEGF-läkemedel har etablerats som en effektiv behandling för till exempel okulära sjukdomar. Bevacizumab är en av de mest använda läkemedlen vid behandling av AMD. På grund av den korta halveringstiden för intravitreal bevacizumab, behövdes flera IVT-injektioner för att upprätthålla en terapeutisk effekt. Tyvärr, kan upprepade IVT-injektioner öka risken för komplikationer och förvärra patientens smärta. Å andra sidan kan en ökning av dosen i en individuell injektion, för att förlänga den terapeutiska effekten, leda till toxiska effekter från höga läkemedelskoncentrationer. Användning av läkemedels inkapsling för att producera långvariga läkemedelskoncentrationer har visat sig vara säkert och effektivt (Ye et al., 2015).

Flera studier har rapporterat om en dosberoende minskning av VEGF-koncentrationer i serum eller intraokulärt efter IVT-injektion av anti-VEGF-läkemedel (Sawada et al., 2010, Lim et al., 2009, Klettner och Roider, 2008). Dessa studier använde sandwich-ELISA-analys med specifika infångnings- och detekteringsantikroppar. Om anti-VEGF-läkemedel binder till samma VEGF-ställen som ELISA-antikroppar kan antikropparna och läkemedlen konkurrera om samma bindningsplatser och leda till fel i VEGF-koncentrationsmätningar. Därför kan användning av sandwich-ELISA vid mätning av patienternas VEGF-koncentrationer leda till felaktiga resultat (Takahashi et al., 2016).

Experimenten i denna avhandling gjordes med direkt-ELISA-analys, vilket betyder att 96-brunnars platta inkuberades först med VEGF och sedan med bevacizumabet som direkt binder till VEGF. Med denna typ av ELISA-analys fanns det inte möjligheter för konkurrens mellan bevacizumab och olika antikroppar. ELISA-analys kan användas för att undersöka farmakokinetik (undersökning om läkemedels omsättning i kroppen) av bevacizumab. Studien visar att denna metod är snabb, exakt och reproducerbar (Ternant

et al., 2007). ELISA-experimenten i detta projekt visar liknande resultat. Varje prov med det inkapslade bevacizumabet analyserades med tre replikat per koncentration och kontrollprovet med intakt bevacizumab var alltid från samma baslösning och kontrollprovet analyserades med minst två replikat. Standardavvikelsen i experimenten var låga och flera olika experiment gav liknande absorbans-värden. Resultaten från proverna kan jämföras med varandra eftersom standardavvikelsen inte överträder den maximala nivån som är statistiskt accepterad. Detta stöder antagandet att ELISA-analys var ett bra val för att undersöka skillnader i bindningsaktiviteten mellan det intakta och det inkapslade bevacizumabet. Resultaten från ELISA-analys stöder hypotesen att det inkapslade bevacizumabet upprätthåller bindningsaktiviteten efter inkapslingen i kiseldioxidmikropartiklar. Resultaten från flera experiment visade att det inkapslade bevacizumabet upprätthåller 75–81 % av bindningsaktiviteten jämfört med det intakta bevacizumabet (Figur 16 B). Olika tidpunkter av upplösningen påverkar inte bindningsaktiviteten hos bevacizumabet. Det antyder att bevacizumab-molekyler som är bundna djupare i mikropartikeln är lika aktiva som de som är nära ytan.

### 6.3 VEGF ökar cellernas överlevnad

VEGF spelar en viktig roll i angiogenes genom att reglera endotelcellernas proliferation, migration och överlevnad. Andra peptid tillväxtfaktorer såsom fibroblasttillväxtfaktor (FGF), angiopoietin, transformerande tillväxtfaktorer (TGF), tumörnekrosfaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), apelin och insulinliknande tillväxtfaktorer (IGF) påverkar endotelcellernas proliferation och funktion i vävnader. De flesta av dessa faktorer påverkar andra celltyper och kompletterar eller koordinerar VEGF-signalerings snarare än att fungera som självständiga regulatorer för angiogenes och endotelcellernas funktioner (Wang et al., 2008).

VEGF har visats vara ett viktigt neurobeskyddande medel i det centrala nervsystemet. Med tanke på dess position som ett anti-angiogenetiskt mål i behandlingar mot sjukdomar är det viktigt att förstå omfattningen av VEGF:s roll för nervcellernas överlevnad. VEGF har visats påverka neuronal tillväxt, differentiering och överlevnad. *In vitro* stimulerar VEGF axonal utväxt, förbättrar överlevnaden av nervceller i organotypiska eksplantatkulturer. *In vivo* koordinerar VEGF migrationen av nervcellernas cellkropp



(soma), medan lokal leverans av VEGF förlänger neuronöverlevnad. Däremot, låga VEGF-nivåer har kopplats till motorisk neurodegeneration i både djurmodeller och sjukdomar i människor. VEGF har visats vara uppreglerad i preliminära tillstånd av ischemi och VEGF spelade en betydande roll i effekter mot ischemisk skada. Anti-VEGF-läkemedel minskade signifikant de skyddande effekterna av VEGF i neuroner vid ischemi (Nishijima et al., 2007).

Resultaten från våra experiment visade att tillsatsen av VEGF ökade cellernas överlevnad och proliferation. Resultatet är förväntat eftersom överlevnadsanalysen baserade sig på tidigare studier där VEGF inducerade HUVEC-cellernas proliferation (Wang et al., 2004). Cellernas överlevnad och proliferation visade en ökning efter flera dagars inkubering med VEGF. Resultaten visar en nedsatt överlevnadsförmåga i celler med den högsta koncentration av VEGF, vilket var oväntat. En möjlig orsak kan vara hög variation i resultaten, vilket innebär att en eller flera mätningar gav avvikande resultat. Eftersom resultaten från överlevnadsanalyserna blev mycket varierande kunde inte olika experimenten jämföras med varandra.

#### **6.4 Bevacizumab inhiberar cellernas överlevnad**

Anti-angiogenetiska behandlingar såsom med bevacizumab hämmar tillväxt av nya blodkärl och inducerar apoptos i endotelceller. Trots framgångar med *in vivo*- och *in vitro*-undersökningar, har antivaskulärterapi med bevacizumab begränsad effekt vid till exempel i äggstockscancer. De exakta underliggande mekanismerna för resistens mot anti-VEGF-läkemedel är inte väl kända. En möjlighet är att tumörens heterogenitet påverkar behandlingsresultaten. Studien undersökte om onormalt tumörendotel kan bidra till behandlingsresistens mot bevacizumab (Guerrouahen et al., 2014). En lösning för att överkomma både läkemedelsresistens och samtidigt minimera negativa biverkningar kan finnas i inkapslingen av anticancerföreningar. Tumörvävnad består vanligtvis av lösa sammankopplingar och intercellulära öppningar mellan 100 och 780 nm i storlek. Läkemedelsbärare i samma storlek kan lätt utnyttja dessa egenskaper och rikta läkemedelsleveransen direkt till tumören. (Tang et al., 2017). Flera olika celltyper såsom kolorektala cancerceller (Zhao et al., 2018), glioblastom-celler (Miranda-Gonçalves et al., 2017) och celler från åderhinnan (Rusovici et al., 2013) används för att undersöka hur

bevacizumab påverkar cellernas överlevnad, proliferation och livsduglighet i normala epitelceller och i olika cancerceller.

Resultaten från överlevnadsanalysen med HUVEC-celler med tillsatt VEGF och bevacizumab stöder resultaten från ELISA-analysen. Cellerna med bevacizumab hade nedsatt överlevnadsförmåga. Nedsatt proliferation av celler inkuberade med bevacizumab har påvisats i flera olika studier (Lee et al., 2008, Peters et al., 2007, Wang et al., 2004). Både det intakta och det inkapslade bevacizumabet visade förmågan att inhibera VEGF i cellkultur. Detta stöder hypotesen att det inkapslade bevacizumabet upprätthåller den biologiska aktiviteten. Både det intakta och det inkapslade bevacizumabet visar nedsatt överlevnad i HUVEC-celler men resultaten antyder att ett visst mol-förhållande krävs mellan bevacizumabet och VEGF för att bevacizumabet ska kunna hämma VEGF. Undersökningen med överlevnadsanalys hade vissa utmaningar. Resultaten mellan experimenten hade signifikanta skillnader i fluorescens-värdena även om experimenten gav liknande resultat med inhiberande effekter av bevacizumab. Statistisk analys kunde inte utföras från resultaten på grund av skillnaderna mellan olika experimenten. Resultaten från överlevnadsanalyserna är endast riktgivande och stöder resultaten från ELISA-analys. Cellblank-proverna med endast cellsuspension gav hög bakgrundssignal med Alamar Blue-reagens och proverna hade hög standardavvikelse. En möjlig orsak kunde vara i Alamar Blue-reagensen som användes. Efter detta pro gradu-projekt har en mer känslig Alamar Blue-reagens använts. Vid optimering av överlevnadsanalys testades olika inkuberingstider med reagensen men detta hade inga effekter i resultaten. Eftersom  $1 \times 10^4$  celler per brunn och 25  $\mu\text{l}$  av Alamar Blue-reagens gav väldigt höga signaler bestämde vi oss för att använda  $6 \times 10^3$  celler per brunn och 10  $\mu\text{l}$  av reagensen. Med mindre celler och Alamar Blue-reagens var fluorescens-värdena ändå tillräckligt höga för att mäta skillnader mellan olika koncentrationer av VEGF och bevacizumab.

## 6.5 Slutsatser och fortsatt forskning

Målet med detta pro gradu-projekt var att undersöka ifall inkapslingen av bevacizumab påverkar proteinets funktionella aktivitet. För att uppnå målet påbörjades projektet med att undersöka bindingsaktiviteten hos det inkapslade bevacizumabet. Undersökningen gjordes med ELISA-analys som mäter hur bevacizumab binder till VEGF. Studien

fortsatte med att analysera den biologiska aktiviteten hos bevacizumabet i cellkultur. Resultaten visar att bevacizumabet kan kapslas in i kiseldioxidmikropartiklar, vilket möjliggör en långvarig frisättning av API. Olika ämnen som används vid inkapslingsprocesser, till exempel Tris-Tween80-buffert, påverkade inte förmågan hos bevacizumabet att binda till VEGF. Det inkapslade bevacizumabet visade likadana resultat i bindningsaktivitet jämfört med kontrollprovet. För att studera om det inkapslade bevacizumabet kan binda till VEGF och påverka cellernas överlevnadsförmåga gjordes ett cellprov med HUVEC-celler. Det inkapslade bevacizumabet behöll den biologiska aktiviteten efter upplösningen. Resultaten från överlevnadsanalyser stöder hypotesen att inkapslat bevacizumab upprätthåller den biologiska aktiviteten. Bevacizumabet kunde inhibera VEGF i levande celler och minska cellernas överlevnad och proliferation. Resultaten antyder att proteiner behåller sin struktur vid inkapslingsprocessen. Ytterligare stöder resultaten hypotesen att kiseldioxidmikropartiklar skyddar det inkapslade API. Kiseldioxid visar potential för att kunna användas som bärare för anti-VEGF-läkemedel.

För vidare forskning vore det intressant att ytterligare optimera överlevnadsanalysen för att få mer repeterbara resultat. Resultat från överlevnadsanalysen hade hög standardavvikelse, vilket påverkar resultaten. Det resultat som vi fått med HUVEC-celler stöder hypotesen att det inkapslade bevacizumabet kan påverka levande celler men dessa resultat kan inte direkt jämföras med kontrollprovet eftersom analysen hade dåligt repeterbarhet. Bättre optimering av överlevnadsanalysen kan möjliggöra statistisk analys. DelsiTech har redan fortsatt med cellprover och hittat ett mer känsligt Alamar Blue-reagens som ger lägre bakgrundssignal.

Vid behandlingar i okulära sjukdomar såsom AMD är målet att förlänga tiden mellan IVT-injektioner. Injicerbart kiseldioxid-hydrogel kan användas i intravitreal leverans där åtminstone en månads långvarig frisättning av API kan uppnås. Det är möjligt att utveckla längre verkande formuleringar med 3–6 månaders kontrollerad utsättning av API. Som med alla leveranssystem är utvecklingen av en ultralång verkande formulering med kiseldioxid-teknik begränsad av den dagliga dosen av API:n, vilket direkt påverkar volymen av det intravitreal injektionsmaterialet. Med en potent molekyl skulle det vara möjligt att utforma produkter med en frisättning i över 12 månader (Jokinen et al., 2016).

DelsiTech har utvecklat en supplösningsmetod där bevacizumabet kan upplösas på ett sätt som simulerar omständigheter kring vätskeflödet i människans öga. I en fortsättning av denna studie kunde olika bevacizumab-prover undersökas där upplösningen är långsammare. I detta pro gradu-projekt undersöktes prover som blivit upplösta i högst 72 timmar. Experimenten som gjordes i detta projekt kunde med olika formuleringar av kiseldioxid förlängas ytterligare med en över tre månaders kontrollerad frisättning av API. Bindningsaktiviteten hos dessa prover kunde undersökas för att kontrollera om bevacizumabet upprätthåller den funktionella aktiviteten för längre tidsperioder. Upplösningshastigheten hos bevacizumabet kunde studeras med RP-HPLC genom att mäta koncentrationen av bevacizumabet i lösningen vid vissa tidpunkter. Detta resultat skulle visa om bevacizumabet upplöses på ett kontrollerat sätt.

Det inkapslade bevacizumabet kunde undersökas med flera olika analysmetoder. Som exempel kunde expression av VEGF analyseras med Western Blot där intakt bevacizumab jämförs med det inkapslade provet i olika koncentrationer och undersöka hur det påverkar uttryck av VEGF. Ytterligare kunde bevacizumabet undersökas med olika celltyper. Bevacizumabets effektivitet har jämförts med ranibizumab som är ett annat anti-VEGF-läkemedel. Dessa studier gjordes med en organkultur från svinögon (Klettner och Roider, 2008). Bevacizumab och ranibizumab kunde kapslas in och med dessa organkulturer kunde deras effektivitet undersökas.

## 7 TILLKÄNNAGIVANDEN

Först och främst vill jag tacka min handledare Lasse Leino på DelsiTech som gav mig chansen att jobba med ett intressant projekt. Tusen tack Mari Päiviö och Jari Mikkola för all praktisk handledning i laboratoriet och för ert tålamod med att förklara alla nya saker för mig. Jag vill även tacka alla andra på DelsiTech som har hjälpt mig under detta pro-gradu arbete och skapat en trivsamt arbetsmiljö.

Ett stort tack går också till min storasyster Sonja som har gett professionella tips för avhandlingen och tack Gustaf för att du har språkgranskat denna avhandling. Er hjälp har varit ovärderlig. Till slut vill jag tacka Teemu som alltid har stöttat mig och hållit en positiv inställning genom mina studier vid Åbo Akademi.

Åbo, 30.03.2020

Minna Lagström

## 8 LITTERATURFÖRTECKING

Abrishami, M. 2009. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (Avastin) for intravitreal administration Retina, 29, 699-703.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2014. Molecular biology of the cell, New York, Garland Science.

Andrade, J. & Potente, M. 2017. New Q(ues) to keep blood vessels growing. The EMBO Journal, e201797764.

Andrew, J. S., Anglin, E. J., Wu, E. C., Chen, M. Y., Cheng, L., Freeman, W. R. & Sailor, M. J. 2010. Sustained Release of a Monoclonal Antibody from Electrochemically Prepared Mesoporous Silicon Oxide. Advanced Functional Materials, 20, 4168-4174.

Ashraf, M. A., Khan, A. M., Ahmad, M. & Sarfraz, M. 2015. Effectiveness of silica based sol-gel microencapsulation method for odorants and flavors leading to sustainable environment. Frontiers in chemistry, 3, 42-42.

Barbé, C., Bartlett, J., Kong, L., Finnie, K., Lin, H. Q., Larkin, M., Calleja, S., Bush, A. & Calleja, G. 2004. Silica Particles: A Novel Drug-Delivery System. Advanced Materials, 16, 1959-1966.

Brody, T. 2018. Chapter 7 - Drug–Drug Interactions: Part One (Small Molecule Drugs). In: BRODY, T. (ed.) FDA's Drug Review Process and the Package Label. Academic Press.

Carmeliet, P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. Oncology, 69 Suppl 3, 4-10.

Chakravarthy, U., Evans, J. & Rosenfeld, P. J. 2010. Age related macular degeneration. Bmj, 340, c981.

Chen, M. H., Wang, L. L., Chung, J. J., Kim, Y.-H., Atluri, P. & Burdick, J. A. 2017. Methods To Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials. ACS Biomaterials Science & Engineering, 3, 3146-3160.

Crawford, Y. & Ferrara, N. 2009. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. Cell Tissue Res, 335, 261-9.

De Aguiar, R. B. & De Moraes, J. Z. 2019. Exploring the Immunological Mechanisms Underlying the Anti-vascular Endothelial Growth Factor Activity in Tumors. *Frontiers in immunology*, 10, 1023-1023.

Dickson, D. J. & Ely, R. L. 2013. Silica sol-gel encapsulation of cyanobacteria: lessons for academic and applied research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1809-1819.

Domigan, C. K., Warren, C. M., Antanesian, V., Happel, K., Ziyad, S., Lee, S., Krall, A., Duan, L., Torres-Collado, A. X., Castellani, L. W., Elashoff, D., Christofk, H. R., Van Der Bliek, A. M., Potente, M. & Iruela-Arispe, M. L. 2015. Autocrine VEGF maintains endothelial survival through regulation of metabolism and autophagy. *Journal of Cell Science*, 128, 2236-2248.

Dunn, B., Miller, J. M., Dave, B. C., Valentine, J. S. & Zink, J. I. 1998. Strategies for encapsulating biomolecules in sol-gel matrices 1 Paper presented at Sympos. Synergistic Synthesis of Inorganic Materials, March 1996, Schloß Ringberg, Germany. *Acta Materialia*, 46, 737-741.

Figg, W. & Folkman, J. 2008. Angiogenesis. In: FIGG, W. D. & FOLKMAN, M. J. (eds.). Springer US.

Folkman, J. 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, 6, 273-86.

Gallarate, M., Trotta, M., Battaglia, L. & Chirio, D. 2009. Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: Preliminary studies on insulin encapsulation. *Journal of Microencapsulation*, 26, 394-402.

Ge-Healthcare. Size exclusion chromatography, Principles and methods, Handbook. <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11639> [13.11 2019].

Guerrouahen, B. S., Pasquier, J., Kaoud, N. A., Maleki, M., Beauchamp, M.-C., Yasmeen, A., Ghiabi, P., Lis, R., Vidal, F., Saleh, A., Gotlieb, W. H., Rafii, S. & Rafii, A. 2014. Akt-Activated Endothelium Constitutes the Niche for Residual Disease and Resistance to Bevacizumab in Ovarian Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13, 3123.

Ibraheem, D., Elaissari, A. & Fessi, H. 2014. Administration strategies for proteins and peptides. *International Journal of Pharmaceutics*, 477, 578-589.

Jain, M., Ganesh, L., Manoj, B., Randhir, C., Shashikant, B. & Chirag, S. 2012. Spray Drying in Pharmaceutical Industry: A Review.

- Jokinen, M., Koskinen, M. & Areva, S. 2008. Rationale of Using Conventional Sol-Gel Derived SiO<sub>2</sub> for Delivery of Biologically Active Agents. *Key Engineering Materials - KEY ENG MAT*, 377, 195-210.
- Jokinen, M., Leino, L. & Griffin, C. 2016. New solutions for ophthalmic drug delivery using biodegradable silica matrix. *ONdrugDelivery*, 2016, 28-30.
- Kazazi-Hyseni, F., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. 2010. Bevacizumab. *The Oncologist*, 15, 819-825.
- Keng, J. C. W., Morita, H. & Ramia, N. T. 1985. Cryoprotective Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Soil Structure During Freeze-Drying. *Soil Science Society of America Journal*, 49, 289-293.
- Klettner, A. & Roider, J. 2008. Comparison of Bevacizumab, Ranibizumab, and Pegaptanib In Vitro: Efficiency and Possible Additional Pathways. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 4523-4527.
- Lee, S. Y., Kim, D.-K., Cho, J. H., Koh, J.-Y. & Yoon, Y. H. 2008. Inhibitory Effect of Bevacizumab on the Angiogenesis and Growth of Retinoblastoma. *Archives of Ophthalmology*, 126, 953-958.
- Levin, P. A. & Dowell, J. E. 2017. Spotlight on bevacizumab and its potential in the treatment of malignant pleural mesothelioma: the evidence to date. *Oncotargets and Therapy*, 10, 2057-2066.
- Li, D., Van Nostrum, C. F., Mastrobattista, E., Vermonden, T. & Hennink, W. E. 2017. Nanogels for intracellular delivery of biotherapeutics. *Journal of Controlled Release*, 259, 16-28.
- Li, F., Hurley, B., Liu, Y., Leonard, B. & Griffith, M. 2012. Controlled release of bevacizumab through nanospheres for extended treatment of age-related macular degeneration. *Open Ophthalmol J*, 6, 54-8.
- Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G. & Wong, T. Y. 2012. Age-related macular degeneration. *The Lancet*, 379, 1728-1738.
- Lim, T. H., Bae, S. H., Cho, Y. J., Lee, J. H., Kim, H. K. & Sohn, Y. H. 2009. Concentration of vascular endothelial growth factor after intracameral bevacizumab injection in eyes with neovascular glaucoma. *Korean journal of ophthalmology : KJO*, 23, 188-192.
- Mancuso, M. R., Davis, R., Norberg, S. M., O'brien, S., Sennino, B., Nakahara, T., Yao, V. J., Inai, T., Brooks, P., Freimark, B., Shalinsky, D. R., Hu-Lowe, D. D. & McDonald,



D. M. 2006. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest*, 116, 2610-21.

Martínez Rivas, C. J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Galindo Rodríguez, S. A., Román, R. Á., Fessi, H. & Elaissari, A. 2017. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532, 66-81.

Masters, K. 2002. *Spray drying in practice*, Denmark, Spray Dry Consult Intl.

Mcclements, D. J. 2018. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 253, 1-22.

Mckay, G. J., Silvestri, G., Orr, N., Chakravarthy, U. & Hughes, A. E. 2009. VEGF and age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 116, 1227.e1-3.

Miranda-Gonçalves, V., Cardoso-Carneiro, D., Valbom, I., Cury, F. P., Silva, V. A., Granja, S., Reis, R. M., Baltazar, F. & Martinho, O. 2017. Metabolic alterations underlying Bevacizumab therapy in glioblastoma cells. *Oncotarget*, 8, 103657-103670.

Mishra, A., Dewangan, G., Singh, W. R., Hazra, S. & Mandal, T. K. 2014. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for determination of curcumin in aqueous humor of rabbit. *J Adv Pharm Technol Res*, 5, 147-9.

Nishijima, K., Ng, Y.-S., Zhong, L., Bradley, J., Schubert, W., Jo, N., Akita, J., Samuelsson, S. J., Robinson, G. S., Adamis, A. P. & Shima, D. T. 2007. Vascular Endothelial Growth Factor-A Is a Survival Factor for Retinal Neurons and a Critical Neuroprotectant during the Adaptive Response to Ischemic Injury. *The American Journal of Pathology*, 171, 53-67.

Noppari, P., Puskala, L., Lagström, M., Päiviö, M. & Leino, L. 2019. Sustained in vitro release of bevacizumab from biodegradable silica microparticle-silica hydrogel composite formulations. *Association for Research in Vision and Ophthalmology*. Vancouver.

Oh, J. K., Lee, D. I. & Park, J. M. 2009. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, 34, 1261-1282.

Park, H.-J., Zhang, Y., Georgescu, S. P., Johnson, K. L., Kong, D. & Galper, J. B. 2006. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Reviews*, 2, 93-101.

Peters, S., Julien, S., Heiduschka, P., Grisanti, S., Ziemssen, F., Adler, M., Schraermeyer, U. & Bartz-Schmidt, K.-U. 2007. Antipermeability and antiproliferative effects of standard and frozen bevacizumab on choroidal endothelial cells. *The British journal of ophthalmology*, 91, 827-831.

Rahman, I. A. 2012. Synthesis of Silica nanoparticles by Sol-Gel: Size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites a review. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1-15.

Rusovici, R., Patel, C. J. & Chalam, K. V. 2013. Bevacizumab inhibits proliferation of choroidal endothelial cells by regulation of the cell cycle. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 7, 321-327.

Sawada, O., Miyake, T., Kakinoki, M., Sawada, T., Kawamura, H. & Ohji, M. 2010. AQUEOUS VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AFTER INTRAVITREAL INJECTION OF PEGAPTANIB OR RANIBIZUMAB IN PATIENTS WITH AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. *Retina-the Journal of Retinal and Vitreous Diseases*, 30, 1034-1038.

Schubert, U. & Hüsing, N. 2019. *Synthesis of Inorganic Materials*, Germany, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

Shih, T. & Lindley, C. 2006. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther*, 28, 1779-802.

Signorello, L., Pucciarelli, S., Bonacucina, G., Polzonetti, V., Cespi, M., Perinelli, D. R., Palmieri, G. F., Pettinari, R., Pettinari, C., Fiorentini, G. & Vincenzetti, S. 2014. Quantification, microbial contamination, physico-chemical stability of repackaged bevacizumab stored under different conditions. *Curr Pharm Biotechnol*, 15, 113-9.

Sinapis, C. I., Routsias, J. G., Sinapis, A. I., Sinapis, D. I., Agrogiannis, G. D., Pantopoulou, A., Theocharis, S. E., Baltatzis, S., Patsouris, E. & Perrea, D. 2011. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin®) in rabbits. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 5, 697-704.

Sosnik, A. & Seremeta, K. P. 2015. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40-54.

Sousa, F., Cruz, A., Fonte, P., Pinto, I. M., Neves-Petersen, M. T. & Sarmiento, B. 2017. A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. *Sci Rep*, 7, 3736.

Tak Yip, W., Zhou, Y., Martyn, T. A. & Gilliland, J. 2009. Silica Sol-Gel Biocomposite Materials for Sensor Development. In: MERHARI, L. (ed.) *Hybrid Nanocomposites for*

Nanotechnology. Electronic, Optical, Magnetic and Biomedical Applications. France: Springer.

Takahashi, H., Nomura, Y., Nishida, J., Fujino, Y., Yanagi, Y. & Kawashima, H. 2016. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Concentration Is Underestimated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Presence of Anti-VEGF Drugs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57, 462-6.

Tang, Y., Soroush, F., Tong, Z., Kiani, M. F. & Wang, B. 2017. Targeted multidrug delivery system to overcome chemoresistance in breast cancer. *International journal of nanomedicine*, 12, 671-681.

Ternant, D., Lecomte, T., Degenne, D., Duveau, A. C., Watier, H. & Paintaud, G. 2007. An enzyme-linked immunosorbent assay to study bevacizumab pharmacokinetics. *Therapeutic Drug Monitoring*, 29, 478-478.

Tiwari, A., Ramalingam, M., Turner, A. P. F. & Kobayashi, H. 2012. *Biomedical Materials and Diagnostic Devices*, Somerset, UNITED STATES, John Wiley & Sons, Incorporated.

Tyagi, P., Koskinen, M., Mikkola, J., Leino, L. & Schwarz, A. 2018. Silica microparticles for sustained zero-order release of an anti-CD40L antibody. *Drug Deliv Transl Res*, 8, 368-374.

Vaishya, R., Khurana, V., Patel, S. & Mitra, A. K. 2015. Long-term delivery of protein therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv*, 12, 415-40.

Wang, S., Li, X., Parra, M., Verdin, E., Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. 2008. Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 7738-7743.

Wang, Y., Fei, D., Vanderlaan, M. & Song, A. 2004. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis*, 7, 335-345.

Verheul, H. M., Lolkema, M. P., Qian, D. Z., Hilkes, Y. H., Liapi, E., Akkerman, J. W., Pili, R. & Voest, E. E. 2007. Platelets take up the monoclonal antibody bevacizumab. *Clin Cancer Res*, 13, 5341-7.

Whitford, D. 2005. *Proteins structure and function*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd.

Viitala, R., Jokinen, M. & Rosenholm, J. B. 2007. Mechanistic studies on release of large and small molecules from biodegradable SiO<sub>2</sub>. *International Journal of Pharmaceutics*, 336, 382-390.

Viitala, R., Jokinen, M., Tuusa, S., Rosenholm, J. B. & Jalonon, H. 2005. Adjustably Bioresorbable Sol-Gel Derived SiO<sub>2</sub> Matrices for Release of Large Biologically Active Molecules. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 36, 147-156.

Wissing, S. A., Kayser, O. & Müller, R. H. 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1257-1272.

Ye, Z., Ji, Y.-L., Ma, X., Wen, J.-G., Wei, W. & Huang, S.-M. 2015. Pharmacokinetics and distributions of bevacizumab by intravitreal injection of bevacizumab-PLGA microspheres in rabbits. *International journal of ophthalmology*, 8, 653-658.

Zhang, A., Singh, S. K., Shirts, M. R., Kumar, S. & Fernandez, E. J. 2012. Distinct Aggregation Mechanisms of Monoclonal Antibody Under Thermal and Freeze-Thaw Stresses Revealed by Hydrogen Exchange. *Pharmaceutical Research*, 29, 236-250.

Zhang, H., Huang, Z., Zou, X. & Liu, T. 2016. Bevacizumab and wound-healing complications: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncotarget*, 7, 82473-82481.

Zhao, Z., Xia, G., Li, N., Su, R., Chen, X. & Zhong, L. 2018. Autophagy Inhibition Promotes Bevacizumab-induced Apoptosis and Proliferation Inhibition in Colorectal Cancer Cells. *Journal of Cancer*, 9, 3407-3416.

## 9 BILAGA 1: RECEPT

### 10 x PBS

- NaCl 80 g
- KCl 2 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,45 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  14,196 g
- Volymen justerades till 1 L med MQ-vatten
- pH justerades till 7,4

### 1xPBS + 0.05 % Tween20 (tvättbuffert)

- 10 x PBS 200 ml
- mqH<sub>2</sub>O 1800 ml
- Tween20 1000 µl

### 1 x PBS + 5 % BSA (blockerande buffert)

- BSA 1,25 g
- 10 x PBS 2,5 ml
- mqH<sub>2</sub>O 22,5 ml

### 1 x PBS + 1 % BSA (utspädningsbuffert)

- BSA 700 mg
- 10 x PBS 7 ml
- mqH<sub>2</sub>O 63 ml

### Odlingsmedium för HUVEC-cellerna före frysning

- Endotelcelltillväxt medium 500 ml
- FBS 10 ml
- Penicillin/streptomycin 1 ml
- Amfotericin B 1,25 ml